

REMARKS

The Examiner is thanked for the telephone interview courteously granted to the undersigned, in connection with the above-identified application. During this telephone interview, proposed language was discussed with the Examiner so as to make clear in the claims that the polypeptide (B) in claim 1, and the polypeptide (B) in claim 5, comprised the amino acid sequence of the recited Sequence ID, and having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1 to 5 amino acids in the amino acid sequence. During this telephone interview, the Examiner also indicated that the polypeptide (B) also needed to recite a function of such polypeptide.

Applicants have amended their claims in light of discussions during the aforementioned telephone interview, and so as to further clarify the definition of the present invention as set forth in the claims being considered on the merits. Specifically, Applicants have amended claim 1 to recite that the polypeptide (B) comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1-5 amino acids in the amino acid sequence; and to recite that the polypeptide in (B) can form a neoculin dimer having a taste-modifying activity.

Applicants have similarly amended polypeptide (B) of claim 5, to recite that this polypeptide (B) comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1-5 amino acids in the amino acid sequence, and to recite that this polypeptide (B) can be processed to a mature polypeptide neoculin acidic subunit which can form a neoculin dimer having a taste-modifying activity.

In connection with these amendments to claims 1 and 5, note, for example, the paragraph bridging pages 5 and 6, and the first full paragraph on page 7, of Applicants' substitute specification (submitted with the Preliminary Amendment filed July 28, 2006). See also pages 15-21 of Applicants' substitute specification.

Initially, it is respectfully requested that the present amendments be entered, notwithstanding the Finality of the Office Action mailed June 1, 2010. In this regard, noting portions of Applicants' specification referred previously, as well as the Examples starting from page 31 thereof, it is respectfully submitted that the present amendments do not raise any issue of new matter; in addition, noting arguments made previously in connection with the above-identified application, it is respectfully submitted that the present amendments do not raise any new issues. Noting further definition of the polypeptide (B) in each of claims 1 and 5, to clarify that the amino acid sequence thereof is the amino acid sequence as specified, except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1-5 amino acids in the amino acid sequence, it is respectfully submitted that the present amendments materially limit issues remaining in the above-identified application; and, at the least, present the claims in better form for appeal. Noting that the present amendments address rationales for rejection set forth for the first time in the Office Action mailed June 1, 2010, it is respectfully submitted that the present amendments are timely.

In view of the foregoing, it is respectfully submitted that Applicants have made the necessary showing under 37 CFR 1.116(b); and that, accordingly, entry of the present amendments is proper.

Applicants respectfully traverse the rejection of their claims under the second paragraph of 35 USC 112, as set forth in Item [19] on pages 4 and 5 of the Office Action mailed June 1, 2010, especially insofar as this rejection is applicable to the

claims as presently amended. Thus, claims 1 and 5, in connection with polypeptide (B), have been amended to recite a polypeptide comprising the amino acid sequence of the specified sequence number “except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1 to 5 amino acids in said amino acid sequence”. In view of amendment of claims 1 and 5 to recite the amino acid sequence of the specified sequence number “except for having substitution”, deletion, etc., it is respectfully submitted that basis for rejection of claims under the second paragraph of 35 USC 112, set forth in the paragraph bridging pages 4 and 5 of the Office Action mailed June 1, 2010, is moot.

The suggestion by the Examiner on page 5 of the Office Action mailed June 1, 2010, to amend (B) of, e.g., claim 1 to recite a polypeptide comprising the amino acid sequence of the specified sequence number “except for substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1 to 5 amino acids”, in lines 3-7 on page 5 of the Office Action mailed June 1, 2010, is noted with thanks. It is respectfully submitted that Applicants have amended each of claims 1 and 5 consistent with the Examiner’s suggestion, reciting the phrase “except for having” substitution, deletion, etc. of no more than 1 to 5 amino acids, such that the basis for rejection of claims under the second paragraph of 35 USC 112, set forth in the paragraph bridging pages 4 and 5 of the Office Action mailed June 1, 2010, is moot.

Applicants respectfully traverse the rejection of their claims under the first paragraph of 35 USC 112, as failing to satisfy the written description requirement, set forth in Item [21] on pages 5-8 of the Office Action mailed June 1, 2010, especially insofar as this rejection is applicable to the claims as presently amended. In connection therewith, the Examiner’s interpretation of previously considered claims, as set forth in the second paragraph on page 6 of the Office Action mailed

June 1, 2010, is noted. Applicants have amended their claims to recite that the polypeptide (B) includes the amino acid sequence of the specified sequence number, except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1-5 amino acids in the amino acid sequence. Thus, it is respectfully submitted that, clearly, the amino acid sequences of the genus of polypeptides of (B) in claims 1 and 5 is not unlimited, but includes no more than 1-5 amino acid changes from that of the specified sequence number. Moreover, claims 1 and 5 have been further amended to specifically set forth the function of the polypeptide of (B) in claims 1 and 5. In view thereof, it is respectfully submitted that the basis for rejection of claims under the first paragraph of 35 USC 112, as failing to satisfy the written description requirement; and, in particular, the basis for this rejection as set forth in the second paragraph on page 6 of the Office Action mailed June 1, 2010, is moot.

Contentions by the Examiner in the paragraph bridging pages 7 and 8 of the Office Action mailed June 1, 2010, are noted. Again, it is emphasized that the present claims recite changes from the recited amino acid sequence number of no more than 1-5 amino acids, and claims 1 and 5 recite the function of polypeptide (B). Clearly, the contention by the Examiner that the amino acid sequence of polypeptides of (B) in claims 1 and 5 is unlimited, and that the function of the polypeptides is unlimited, is incorrect with respect to presently amended claims 1 and 5.

The additional contention by the Examiner in the second full paragraph on page 8 of the Office Action mailed June 1, 2010, is noted. Clearly, with respect to presently amended claims, the genus of polypeptides of (B) of claims 1 and 5 is not both structurally and functionally unlimited. To the contrary, it is respectfully submitted that the polypeptides of part (B) of claims 1 and 5 has a variation of not

more than 1-5 amino acids, with claims 1 and 5 defining a function of the polypeptide, such that the description requirement of the first paragraph of 35 USC 112, is clearly satisfied.

Applicants respectfully traverse the rejection of their claims under the first paragraph of 35 USC 112, as failing to satisfy the enablement requirement, set forth in Item [22] on pages 8-13 of the Office Action mailed June 1, 2010, particularly insofar as this rejection is applicable to the claims as presently amended. In connection with this rejection, and as set forth in the last full paragraph on page 10 of the Office Action mailed June 1, 2010, the Examiner has based this rejection in interpreting Applicants' claims as not limiting the amino acid sequences of the polypeptide (B) and as not limiting the function thereof. However, as discussed previously, claims 1 and 5 have been amended to recite a variation of not more than 1-5 amino acids, and have further amended claims 1 and 5 to recite a function of the polypeptide (B). Accordingly, it is respectfully submitted that the basis for rejection of claims as failing to satisfy the enablement requirement of 35 USC 112, first paragraph, set forth in Item [22] on pages 8-13 of the Office Action mailed June 1, 2010, is moot.

Applicants respectfully submit that all of the claims presented for consideration on the merits by the Examiner patentably distinguish over the teachings of the documents applied by the Examiner in rejecting claims in the Office Action mailed June 1, 2010, that is, the teachings of the articles by Yamashita, et al., "Purification and Complete Amino Acid Sequence of a New Type of Sweet Protein with Taste-modifying Activity, Curculin*", in The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 26, issue of September 15, 1990, pp. 15770-15775; Shimizu-Ibuka, et al., "Crystal Structure of Neoculin: Insights into its Sweetness and Taste-modifying

Activity”, in J. Mol. Biol., (2006), 359, pp. 145-158; and Suzuki, et al., “Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities”, in FEBS LETTERS, 573, (2004), pp. 135-138, under the provisions of 35 USC 102 and 35 USC 103.

Initially, Applicants note the rejection of claims 1 and 5 under 35 USC 102(b), as set forth in Item [24] on pages 13 and 14 of the Office Action mailed June 1, 2010. It is noted that this rejection is based upon the Examiner’s interpretation of claims 1 and 5, that the polypeptide of (B) has a number of variations from SEQ ID NO: 2 or 3 which are unlimited, and wherein the function of the polypeptide of part (B) of claims 1 and 5 is unlimited. However, as clearly shown supra, the claims as presently amended recite amino acid variations of the specified sequence which is not more than 1-5, with the function of the polypeptide of (B) of claims 1 and 5 being set forth. Accordingly, basis for the rejection of claims 1 and 5 under 35 USC 102(b) as set forth in Item [24] on pages 13 and 14 of the Office Action mailed June 1, 2010, is moot.

To the contrary, in comparing the curculin (NBS) described in Yamashita, et al., with the polypeptide (NAS) of SEQ ID NO: 2, the polypeptide in Yamashita, et al. has 29 substitutions and has 74.6% homology with the polypeptide of SEQ ID NO: 2. Note the enclosed Table, comparing the amino acid sequence between neoculin and the curculin of Yamashita, et al. Note also that the homology of curculin (NBS) of Yamashita, et al., with the polypeptide of SEQ ID NO: 3 of the present application, is less than 74.6%.

As can be seen from the foregoing, clearly the teachings of Yamashita, et al., as applied in Item [24] on pages 13 and 14 of the Office Action mailed June 1, 2010, would have neither disclosed, nor would have suggested, such isolated polypeptide

neoculin acidic subunit or such isolated polypeptide neoculin acidic subunit precursor as in the present claims, which includes the amino acid sequence except for having substitution, deletion, insertion, addition or inversion of no more than 1-5 amino acids in the specified amino acid sequence, and advantages achieved thereby.

Applicants respectfully traverse the rejection of claims 2 and 6 as anticipated by, or, in the alternative, under 35 USC 103 as obvious over, Yamashita, et al. "as evidenced by Suzuki . . . and Shimizu-Ibuka et al."

It is respectfully submitted that the teachings of these references as applied by the Examiner, with Suzuki, et al. and Shimizu-Ibuka, et al. only being applied as extrinsic evidence, would have neither disclosed nor would have suggested the isolated polypeptide neoculin acidic subunit and isolated polypeptide neoculin acidic subunit precursor as set forth in the present claims, including the polypeptide (A) of the specified amino acid sequence in SEQ ID NO: 2 or NO: 3, or having variation therefrom of no more than 1-5 amino acids (see claims 1 and 5); and, moreover, wherein the isolated polypeptide is glycosylated with an N-linked sugar chain comprising mannose/N-acetylglucosamine/fucose/xylose at a ratio of 3/2/1/1 (note claims 2 and 6).

The invention as being considered on the merits in the above-identified application is directed to an isolated polypeptide neoculin acidic subunit or precursor thereof. Such isolated polypeptide has a taste-modifying activity, to give a substance a sweet taste.

The present inventors have found that neoculin greatly reduced the sourness, bitterness or astringency of foods and drinks, and additionally that neoculin has an activity to enhance the taste of foods and drinks, namely, a taste-modifying activity. The present inventors have found that neoculin has a far better taste-modifying

action than that of curculin, and is highly practically applicable. Note, e.g., pages 4 and 5 of Applicants' substitute specification.

As to advantages achieved by the present invention, note comparison of the taste-modifying activities of neoculin and curculin, set forth in Example 10 on pages 47-49 of Applicants' substitute specification. As can be seen particularly in Table 5 on page 49, and as discussed under this table, the taste-modifying activity of neoculin was far stronger than the taste-modifying activity of curculin.

Yamashita, et al. reports on a study in which a new type of protein which elicits a sweet taste and also has taste-modifying activities has been found, this protein having been isolated from the fruits of *Curculigo latifolia*, this plant being a stemless herb which grows wild in western Malaysia. This study indicates that the active principal has been purified, and named curculin, and the article reports on the complete amino acid sequence of curculin, which is a dimer of a polypeptide with 114 residues. Note the first two paragraphs in the right-hand column on page 15770. Yamashita, et al. is a first report about an isolation of curculin, reporting that curculin is a dimer of two curculin polypeptides (NBSs).

It is emphasized that this article discloses and identifies curculin. It is respectfully submitted that the teachings of this reference do not disclose, nor would have suggested, the isolated polypeptide neoculin acidic subunit or precursor thereof as in the claims presently being considered on the merits, much less advantage thereof as seen, for example, in Example 10 of Applicants' disclosure, discussed previously.

After Yamashita, et al. was published, curculin B (see JP 10-215884), as well as curculin C (see USP 5,395,921) have been reported as polypeptide (subunits) constituting curculin, beside the curculin disclosed in Yamashita, et al. Enclosed

please find copies of the above-mentioned JP 10-215884 and USP 5,395,921. As can be seen therefrom, prior to the present invention there were a number of polypeptides (subunits) constituting curculin, and those skilled in the art recognized that these polypeptides were all present as homodimers.

In contrast, according to the present invention, the present inventors separated and identified a novel protein dimer having a taste modifying activity, finding that the protein dimer is a heterodimer comprising a novel polypeptide NAS (the polypeptide of SEQ ID NO: 2) and NBS. It is respectfully submitted that the present inventors were the first to clarify the presence of a heterodimer in curculin; and that this heterodimer, named "neoculin" by the present inventors, has a remarkable taste-modifying activity. It is respectfully submitted that the teachings of Yamashita, et al. would have neither disclosed nor would have suggested such heterodimer of the present invention, and advantages thereof, e.g., a remarkable taste-modifying activity.

It is respectfully submitted that Suzuki, et al. and Shimizu-Ibuka, et al. correspond to the present invention, it being emphasized that each was published after the priority date of the present application. Suzuki, et al. reports on the isolation of a gene that encodes a novel protein highly homologous to curculin, it being disclosed therein that sweet-tasting and taste-modifying activities were exhibited solely by the heterodimer of curculin 1 and curculin 2.

Shimizu-Ibuka, et al. reports on the crystal structure of neoculin.

However, noting the various curculin materials, as seen in Yamashita, et al. and the enclosed Japanese patent document and enclosed U.S. patent, with Suzuki, et al. and Shimizu-Ibuka, et al. not being prior art, it is respectfully submitted that the teachings of the applied references do not disclose, nor would have suggested, the

isolated polypeptide neoculin acidic subunit as in the present claims, or precursor thereof as in the present claims, and advantages thereof.

In particular, it is respectfully submitted that even in light of the teachings of Suzuki, et al. and Shimizu-Ibuka, et al., it would not have been inherent that a neoculin acid subunit is present as a subunit constituting curculin, noting the enclosed Japanese patent document and the enclosed U.S. patent; and as the two articles are not prior art, such neoculin acid subunit would not have been obvious.

In view of the foregoing comments and amendments, entry of the present amendments, and reconsideration and allowance of all claims presently pending in the above-identified application, are respectfully requested.

Applicants request any shortage of fees due in connection with the filing of this paper be charged to the Deposit Account of Antonelli, Terry, Stout & Kraus, LLP, Deposit Account No. 01-2135 (case 1333.46425X00), and please credit any excess fees to such Deposit Account.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP

By /William I. Solomon/

William I. Solomon

Registration No. 28,565

Enclosures: Table (Comparison of amino acid sequence in Curculin and Neoculin);
JP 10-215884; USP 5,395,921

WIS/ksh
1300 17th Street N., Suite 1800
Arlington, VA 22209
Tel: 703-312-6600
Fax: 703-312-6666

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-215884

(43)Date of publication of application : 18.08.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A01H 5/00
A23J 3/14
A23L 1/00
A23L 1/22
C07K 14/415
C12N 5/10
C12P 21/02
// (C12N 15/09
C12R 1:91)
(C12N 5/10
C12R 1:91)
(C12P 21/02
C12R 1:91)

(21)Application number : 09-352320

(71)Applicant : KURIHARA YOSHIE

ARAI SOICHI

MEIJI SEIKA KAISHA LTD

ASAHI DENKA KOGYO KK

(22)Date of filing : 05.12.1997

(72)Inventor : KURIHARA YOSHIE

ARAI SOICHI

ANZAI HIROYUKI

KATSUMATA KAZUKO

YAMASHITA HARUYUKI

SUGIYAMA HIROSHI

(30)Priority

Priority number : 08342706 Priority date : 06.12.1996 Priority country : JP

(54) SOURNESS REPRESSANT, PLASMID FOR PLANT, TRANSFORMED CELL AND PLANT, AND PRODUCTION OF CURCULIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce curculin B repressing sourness and having activity of reducing sourness or making itself tasteless as an effective component in sourness repressive agent suitable for foods by producing curculin B through transformed cells originated from plants.

SOLUTION: Curculin B which is a polypeptide including an amino acid sequence of the formula is produced through transformed cells or transformed plants containing them. Deoxyribonucleic acids coding the curculin B are prepared by means of a known genetic technology method and/or a chemical synthetic method. The base sequence wholly coding the complementary deoxyribonucleic acid(cDNA) of the curculin B is disclosed in the Japan Patent official gazette H06-189771. The curculin B is obtained e.g. by transforming cells originated from plants with a plasmid including the cDNA between a sequence containing a promoter able to functionate in plants and a sequence containing a terminator able to functionate in plants and then by extracting the curculin B from the resultant transformant.

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報 （A）

(11)特許出願公開番号

特開平10－215884

(43)公開日 平成10年(1998) 8 月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A
A 2 3 J 3/14		A 2 3 J 3/14	
A 2 3 L 1/00		A 2 3 L 1/00	H
1/22		1/22	Z
審査請求 未請求 請求項の数11 F D （全 13 頁） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平9－352320	(71)出願人	391026254 栗原 良枝 東京都世田谷区奥沢 7－4－7
(22)出願日	平成 9 年(1997)12月 5 日	(71)出願人	591058998 荒井 綜一 神奈川県横浜市神奈川区七島町38
(31)優先権主張番号	特願平8－342706	(71)出願人	000006091 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋 2 丁目 4 番16号
(32)優先日	平 8 (1996)12月 6 日	(71)出願人	000000387 旭電化工業株式会社 東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番35号
(33)優先権主張国	日本（J P）	(74)代理人	弁理士 森田 憲一 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酸味抑制剤、植物用プラスミド、形質転換細胞及び形質転換植物、並びにクルクリン製造方法

(57)【要約】

【課題】 酸味を抑制して酸味を軽減ないし無味化することのできる酸味抑制剤を提供する。食品用として好適なクルクリンB又はクルクリンB類似体の大量生産に利用可能な植物用プラスミド、及びそれを用いるクルクリンB又はクルクリンB類似体の製造方法を提供する。

【解決手段】 酸味抑制剤は、クルクリンB又はクルクリンB類似体を有効成分として含む。植物用プラスミドは、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNAを、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間に含む。前記植物用プラスミドで、植物由来の細胞を形質転換して得られる形質転換細胞又は形質転換植物から、クルクリンB又はクルクリンB類似体を抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は(2) 前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、酸味抑制剤。

【請求項2】 (1) 配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA、又は(2) 前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドをコードするDNAを、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間に含むことを特徴とする、プラスミド。

【請求項3】 前記プロモーターが、トウモロコシユビキチンプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、及びイネアクチンプロモーターからなる群から選んだプロモーターである、請求項2に記載のプラスミド。

【請求項4】 前記ターミネーターが、ノパリンシンターゼターミネーター又はカリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーターである、請求項2又は請求項3に記載のプラスミド。

【請求項5】 前記プロモーターを含む配列内の、プロモーターの制御配列を含む配列の3'末端と、前記ターミネーターを含む配列内の、ターミネーターの制御配列を含む配列の5'末端との間に、植物で機能することのできるイントロンを更に含む、請求項2～請求項4のいずれか一項に記載のプラスミド。

【請求項6】 前記イントロンが、トウモロコシユビキチンイントロンである請求項5に記載のプラスミド。

【請求項7】 請求項2～請求項6のいずれか一項に記載のプラスミドで、植物(但し、クルクリゴ・ラチフォリアを除く)由来の細胞を形質転換して得られることを特徴とする、形質転換細胞。

【請求項8】 前記植物が食用植物である、請求項7に記載の形質転換細胞。

【請求項9】 請求項7に記載の形質転換細胞を含む、形質転換植物。

【請求項10】 前記植物が食用植物である、請求項9に記載の形質転換植物。

【請求項11】 請求項7若しくは請求項11に記載の形質転換細胞又は請求項9若しくは請求項13に記載の形質転換植物から、(1) 配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は(2) 前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを抽出するこ

とを特徴とする、前記ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸味抑制剤、植物用プラスミド、そのプラスミドで形質転換することにより得られる形質転換細胞及び形質転換植物、並びにその形質転換細胞又は形質転換植物を用いるクルクリンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】クルクリゴ・ラチフォリア(*Curculigo latifolia*)は、マレーシアやタイ等に自生するキンバイザサ科(あるいは、分類の仕方によってはヒガンバナ科)に属する植物である。このクルクリゴ・ラチフォリアの果実に含まれるタンパク質であるクルクリンは、それ自体が甘味を有し、無味な飲食物(例えば、水)を甘く感じさせる活性を有すると共に、酸味を甘味に感じさせる活性も有することが知られている。マレーシアでは、クルクリゴ・ラチフォリアの果実を砂糖の代替物としてコーヒーや紅茶を飲むときに用いたり、時には肉を煮る際の軟化剤として、あるいは、食欲増進剤として用いてきた歴史がある。クルクリンのアミノ酸配列については、クルクリン同族体の1つであるクルクリンAの全アミノ酸配列が特開平3-190899号公報に開示され、クルクリン同族体の1つであるクルクリンBの成熟体及び前駆体の塩基配列及びアミノ酸配列が特開平6-189771号公報に開示されている。

【0003】クルクリンの生産は、特開平2-104263号、特開平2-84157号、特開平2-84160号、及び特開平2-84161号の各公報に記載の技術を用いることにより実施することが可能である。これらの方法では、クルクリゴ・ラチフォリアの果実よりクルクリンAを抽出している。従って、例えば、果実の収量、又はクルクリンAの含有量などの変動を受けやすく、しかも、クルクリゴ・ラチフォリアの果実の処理が煩雑であるので、クルクリンの大量生産は困難であった。近年、遺伝子工学的技術を用いた微生物への有用遺伝子の導入の試みが数多く進められ、これまで大量生産が困難であった有用タンパク質の大量生産が可能となった。例えば、特開平6-189771号公報では、クルクリンBのcDNAをコードする全塩基配列を解明し、クルクリンBをコードするcDNAをクローン化したプラスミドで形質転換した微生物により、組換えクルクリンBを生産させている。しかし、この組換えクルクリンBは、宿主として大腸菌を用いて生産されており、大腸菌由来であるため、食品としては一部の消費者に避けられる傾向があり、微生物由来ではないクルクリンの生産方法の開発が待たれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、食品用と

して更に好適で、大量生産が可能な、クルクリンの製造方法を鋭意探索したところ、植物由来の形質転換細胞又はそれを含む形質転換植物を用いることによって、これらの課題を解決することができることを見出した。また、本発明者は、その製造方法により製造されたクルクリンBが、意外にも、酸味を抑制して酸味を軽減ないし無味化する活性を有することを見出した。この酸味抑制活性は、従来公知のクルクリン活性（すなわち、それ自体が甘味を有するか、あるいは酸味を甘味に感じさせる活性）とはまったく異なる活性である。本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、酸味抑制剤に関する。

【0006】また、本発明は、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドをコードするDNAを、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列と、植物で機能することのできるターミネーターを含む配列との間を含むことを特徴とする、プラスミドに関する。また、本発明は、前記プラスミドで、植物（但し、クルクリゴ・ラチフォリアを除く）由来の細胞を形質転換して得られることを特徴とする、形質転換細胞に関する。また、本発明は、前記形質転換細胞を含む、形質転換植物に関する。更に、本発明は、前記形質転換細胞又は前記形質転換植物から、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを抽出すること、を特徴とする、前記ポリペプチドの製造方法に関する。

【0007】本明細書において、「植物」とは、生物全体を、微生物、動物、及び植物に分類した場合の植物であって、光合成が可能な多細胞の分化有機体、又はその一部分を意味する。前記「植物」には、コケ、シダ、裸子植物、及び被子植物などが含まれる。また、前記の光合成が可能な有機体における一部分も、それ自体が光合成を行わない部分（例えば、果実又は根など）であっても、本発明の植物に含まれる。また、「植物細胞」とは、植物に由来する任意の細胞を意味し、例えば、プロトプラスト、未分化組織（例えば、カルス）、種子、胎芽、花粉、植物胚、不定胚、又は人工種子などを含む。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の酸味抑制剤は、有効成分として、（１）配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は（２）配列表の配列番号1で表わされる前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有するポリペプチドを含有する。配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含む前記ポリペプチドとしては、例えば、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるクルクリンBを挙げることができる。配列表の配列番号1で表わされる前記アミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されたアミノ酸配列を有し、しかも酸味抑制活性を有する前記ポリペプチドを、以下、クルクリンB類似体と称する。

【0009】本明細書において、「クルクリンB類似体」とは、クルクリンBのアミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、しかも酸味抑制作用を有するポリペプチドを意味する。付加、欠失、又は置換することのできるアミノ酸の数及び種類は特に限定されるものではなく、その酸味抑制作用に基づいて、当業者が適宜、類似体を作成することができる。

【0010】本明細書において「酸味抑制活性」とは、酸味を示す飲食物の酸味を抑える活性、すなわち、酸味を軽減ないし無味化する活性を意味する。或る化合物が前記酸味抑制活性を有するか否かは、例えば、以下に示す官能試験によって決定することができる。すなわち、はじめに、酸味レベル基準物質水溶液（例えば、約0.1Mクエン酸水溶液）を口中にふくみ、酸味の基準レベルを記憶する。次に、酸味を全く感じなくなるまで、口中を水で十分に（例えば、数回）すすぐ。所定濃度の供試化合物水溶液（例えば、クルクリンB類似体水溶液）所定量（例えば、約2～5ml）を口中に所定時間（例えば、約2～5分間）ふくみ、その後、それを吐き出す。必要により、口中を水で軽くすすぐ。続いて、前記の酸味レベル基準物質水溶液を、前記と同じ方法で口中にふくみ、そのときに感じる酸味レベルと、前記の酸味基準レベルとの差異を判定する。前記の酸味基準レベルよりも酸味レベルが有意に抑制されるか否かによって、酸味抑制活性を有するか否かを決定することができる。

【0011】本発明のプラスミドは、少なくとも、

（１）植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、（２）クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び（３）植物で機能することのできるターミネーターを含む配列を、そのプラスミド上に含む。前記プロモーターを含む配列は、クルクリンB又はその類似体をコードするDNAの5'上流側に位置し、

そして、前記ターミネーターを含む配列は、クルクリン又はその類似体をコードするDNAの3'下流側に位置する。

【0012】クルクリンBは、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなる。クルクリンBは、N末端にシグナルペプチド（配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列における第22番目のアミノ酸～第1番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなるペプチド）を含み、更に、C末端に延長ペプチド（配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列における第115番目のアミノ酸～第136番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなるペプチド）を含む、配列表の配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体（すなわち、未成熟体）の形で植物細胞内で産生され、プロセッシングによりこのシグナルペプチド及び延長ペプチドが脱離して、配列表の配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなる成熟体になるものと推定されている。

【0013】本発明のプラスミドにおいては、クルクリンBをコードするDNAに代えて、クルクリンBをコードする塩基配列を含むDNAを用いることができ、このようなDNAとして、例えば、「成熟体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、シグナルペプチド及び延長ペプチドの両方を含む「前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、シグナルペプチドを含むが延長ペプチドが欠失している「延長ペプチド欠失-前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNA、又は延長ペプチドを含むがシグナルペプチドが欠失している「シグナルペプチド欠失-前駆体型」クルクリンBをコードする塩基配列（例えば、配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）からなるDNAなどを用いることができる。

【0014】本発明のプラスミドにおいては、クルクリンBをコードするDNAに代えて、クルクリンB類似体をコードするDNA、又はクルクリンB類似体をコードする塩基配列を含むDNAを用いることができる。クルクリンB類似体をコードする塩基配列を含むDNAとして、クルクリンBをコードする塩基配列を含むDNAの場合と同様に、例えば、成熟体、前駆体、延長ペプチド欠失-前駆体型、又はシグナルペプチド欠失-前駆体などの種々のクルクリンB類似体をコードする塩基配列からなるDNAを用いることができる。

【0015】クルクリンB又はクルクリンB類似体をコ

ードするDNAは、例えば、公知の遺伝子工学的手法若しくは化学合成法、又はそれらの組合せによって調製することができる。クルクリンB cDNA又はクルクリンB類似体cDNAを含むプラスミドが得られている場合には、ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR法と称する）により所望のDNAを容易に調製することができる。例えば、前駆体型クルクリンBをコードする塩基配列を含むcDNA（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列）を保持するプラスミドpQ9（プラスミドpQ9の構造及び調製方法については、特開平6-189771号公報に開示されており、その調製方法の概要については、後述する実施例1に示す）は、シグナルペプチドをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第11番目の塩基～第76番目の塩基からなる塩基配列）、成熟型クルクリンBをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第77番目の塩基～第418番目の塩基からなる塩基配列）、及び延長ペプチドをコードする塩基配列（配列表の配列番号3で表わされる塩基配列における第419番目の塩基～第484番目の塩基からなる塩基配列）を含むので、適当なプライマーを選択し、前記プラスミドpQ9を鋳型として用いるPCR法を実施することによって、成熟体、前駆体、延長ペプチド欠失-前駆体型、又はシグナルペプチド欠失-前駆体などの種々のクルクリンBをコードする塩基配列を調製することができる。

【0016】PCR法に用いるプライマーとしては、例えば、オリゴデオキシリボヌクレオチド、又はオリゴリボヌクレオチドを使用することができる。センスプライマーとしては、例えば、目的タンパク質のアミノ末端部（アミノ末端のアミノ酸を含む）の任意の長さ（通常、6～10個）のアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'側末端に、タンパク質翻訳の開始コドン（ATG）配列を連結した合成ヌクレオチドを設計することができる。なお、目的タンパク質のアミノ末端がATGである場合には、ATG配列を連結するとATG配列が重複するので、目的タンパク質のアミノ末端部の任意の長さのアミノ酸配列をコードする塩基配列を、そのままセンスプライマーとして用いることができる。また、センスプライマーに、翻訳開始周辺の塩基配列に関して翻訳効率に関与すると言われる、いわゆるコザックの法則[Kozak等, Microbiol. Reviews, 47巻, 第1頁～第45頁(1983年)]に従う塩基配列ACCATGGを付加することも、タンパク質の生産量を高める上で好ましい。

【0017】アンチセンスプライマーとしては、例えば、目的タンパク質のカルボキシ末端部（カルボキシ末端のアミノ酸を含む）の任意の長さ（通常、6～10個）のアミノ酸配列をコードする塩基配列の3'側末端に、タンパク質翻訳の停止コドン（TAA、TAG、又

はTGA)配列を1個又は複数個(好ましくは1又は2個、より好ましくは2個)を連結した合成ヌクレオチドを設計することができる。

【0018】また、PCR法を行なうことにより増幅した断片のセンスプライマー及び／又はアンチセンスプライマーの5'末端に、前記断片を挿入したい部位を切断することのできる制限酵素に対応した制限酵素切断部位を設けると、プロモーター配列又はターミネーター配列、所望によりイントロン配列を含んでなる配列の前記制限酵素切断部位に前記断片を挿入することができるので、好ましい。

【0019】本発明のプラスミドにおいて用いることのできるプロモーターは、植物で機能することのできるプロモーターであれば特に限定されるものではなく、クルクリゴ・ラチフォリアのクルクリンプロモーター以外のプロモーターであることが好ましい。ここで「植物で機能することのできるプロモーター」とは、そのプロモーターを植物内に導入した場合に、RNAポリメラーゼが特異的に結合してその下流方向に転写をはじめることのできるプロモーターを意味する。前記プロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター[ザ・エンボジャーナル、第6巻、第3901頁～第3907頁(1987年)]、アクチンプロモーター(特にイネアクチンプロモーター)[R. Wu等、ザ・プラントセル、第2巻、第163頁～第171頁(1990年)]、ユビキチンプロモーター(特にトウモロコシユビキチンプロモーター)[Christensen, プラント・モレキュラー・バイオロジー、第18巻、第675頁～第689頁(1992年)]、又はTR1'プロモーター若しくはTR2'プロモーター等を挙げることができる。宿主としてイネを用いる場合には、ユビキチンプロモーター(特にトウモロコシユビキチンプロモーター)が特に好ましい。宿主としてミカン科に属する植物(例えば、レモン又はオレンジ等)を用いる場合には、TR1'プロモーター若しくはTR2'プロモーター[A. Vardi等、プラント・サイエンス、第69巻、第199頁～第206頁(1990年)]、又はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター[T. Hidaka等、Japan. J. Breed., 第40巻、第199頁～第207頁(1990年)]が特に好ましい。

【0020】本発明のプラスミドにおいて用いることのできるターミネーターは、植物で機能することのできるターミネーターであれば特に限定されるものではなく、クルクリゴ・ラチフォリアのクルクリンターミネーター以外のターミネーターであることが好ましい。ここで「植物で機能することのできるターミネーター」とは、そのターミネーターを植物内に導入した場合に、その上流方向からの転写を終結させ、ポリAを付加させることのできるターミネーターを意味する。前記ターミネータ

ーとしては、ノパリンシンターゼターミネーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター、又はオクトピンシンターゼターミネーター等を挙げることができる。宿主としてイネを用いる場合には、ノパリンシンターゼターミネーターが好ましい。宿主としてミカン科に属する植物(例えば、レモン又はオレンジ等)を用いる場合には、オクトピンシンターゼターミネーター[A. Vardi等、プラント・サイエンス、第69巻、第199頁～第206頁(1990年)]、又はノパリンシンターゼターミネーター[T. Hidaka等、Japan. J. Breed., 第40巻、第199頁～第207頁(1990年)]が特に好ましい。植物で機能することのできるプロモーター及び／又はターミネーターを含まないプラスミド(例えば、微生物用のプラスミド)では、植物に導入した際、正常に発現しない。

【0021】本発明のプラスミドにおいて、前記プロモーターを含む配列内の、プロモーターの制御配列を含む配列の3'末端と、前記ターミネーターを含む配列内の、ターミネーターの制御配列を含む配列の5'末端との間に、植物で機能することのできるイントロンを更に設けると、遺伝子の発現効率を上げることができたり、あるいは、mRNAの安定性を上げることのできるので好ましい。ここで「植物で機能することのできるイントロン」とは、そのイントロンを植物に導入した場合に、mRNAの核外への移行又はスプライシングに際し、取り除くことのできるイントロンを意味する。前記イントロンとしては、例えば、ヒマ・カタラーゼイントロン[田中等、ヌクレック・アシッド・リサーチ、第18巻、第6767頁～第6770頁(1990年)]、又はトウモロコシユビキチンイントロン[Christensen, プラント・モレキュラー・バイオロジー、第18巻、第675頁～第689頁(1992年)]が使用できる。宿主としてイネを用いる場合は、トウモロコシユビキチンイントロンが特に好ましい。

【0022】本発明のプラスミドでは、イントロンを設ける場合に、イントロンを挿入する場所は、前記範囲内であれば特に限定されるものではないが、プロモーターを含む配列と、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNAとの間に挿入することが好ましい。なお、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA中へ前記イントロンを挿入する場合にも、その箇所は特に限定されるものではない。

【0023】本発明のプラスミドの構築手順は特に限定されるものではなく、例えば、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び植物で機能することのできるターミネーターを含む配列をすべて連結した後、適当なプラスミドに一度に挿入することもできるし、それぞれ別々に適当なプラスミドに順次挿入するこ

ともできる。一般には、植物で機能することのできるプロモーター及びターミネーター、場合により更にイントロンを含むプラスミドを予め調製し、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNAを前記プラスミドに挿入することが好ましい。

【0024】植物で機能することのできるプロモーター及びターミネーター、場合により更にイントロンを含むプラスミドであって、プロモーターとターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することのできる前記プラスミドとしては、例えば、pUBA〔土岐等、プラント・フィジオロジー、第100巻、第1503頁～第1507頁（1992年）〕、又はpBI121（クローンテック社）などを挙げることができる。プラスミドpUBAは、パーティクルガン法等の直接導入法に用いることができ、プロモーターに続くイントロンと、ターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することができる。また、プラスミドpBI121は、アグロバクテリウムを介した導入法に用いることができ、プロモーターとターミネーターとの間に所望のDNAを挿入することができる。

【0025】本発明による形質転換細胞の宿主として用いることのできる植物由来の細胞における前記植物としては、クルクリゴ・ラチフォリアを除く任意の植物を用いることができ、高等植物を用いることが好ましく、食用植物を用いることがより好ましい。本明細書において、「食用植物」とは、それ自体の一部若しくは全部を直接食用とすることのできる植物、又はそれ自体の一部若しくは全部を食品の原料とすることのできる植物を意味する。前記食用植物としては、例えば、ナス科（トマト、若しくはジャガイモ等）、アブラナ科（アブラナ、ダイコン、キャベツ、ブロッコリー、若しくはカリフラワー等）、セリ科（ニンジン等）、ウリ科（メロン、若しくはキュウリ等）、イネ科（イネ、若しくはトウモロコシ等）、バラ科（リンゴ、若しくはモモ等）、ミカン科（ミカン、オレンジ、若しくはレモン等）、マメ科（ダイズ等）、キク科（レタス、ヒマワリ、若しくはベニバナ等）、又はヒルガオ科（サツマイモ等）などの各植物を挙げることができる。

【0026】構築したプラスミドを植物に導入する方法としては、植物の形質転換法として確立されている任意の方法を利用することができる。このような方法としては、例えば、直接導入法、又はアグロバクテリウムを介した導入方法などを挙げることができる。直接導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法又はポリエチレングリコール法を用いて植物プロトプラストへ直接導入することができる。あるいは、マイクロプロジェクトイルを利用して植物細胞に直接導入するパーティクルガン法などを挙げることができる。宿主としてイネを用いる場合は、パーティクルガン法又はアグロバクテリウムを介した導入方法が好ましい。また、形質転換する細胞

としては、使用する導入方法に応じて、その導入方法に適した細胞を用いることができる。宿主としてイネを用いる場合は、適切な細胞として、例えば、未熟種子若しくは完熟種子より摘出した胚、又は誘導したカルスを用いることができる。

【0027】本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、クルクリンB又はクルクリンB類似体を植物内で発現することが可能なカセット（以下、クルクリンBカセットと称することがある）、すなわち、植物で機能することのできるプロモーターを含む配列、クルクリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA、及び植物で機能することのできるターミネーターを含む配列を含むカセットと、植物内で選抜マーカ―遺伝子を発現することが可能なカセット（以下、選抜マーカ―遺伝子カセットと称することがある）とを同時に植物細胞に導入することができる。

【0028】選抜マーカ―遺伝子としては、例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、又はビアラホス耐性遺伝子などを用いることができる。なお、導入する植物が、単子葉植物であるイネ科植物などの場合は、ビアラホス耐性（bar）遺伝子が大変有効であり〔土岐等、プラント・フィジオロジー、第100巻、第1503頁～第1507頁（1992年）〕、特に好ましい。宿主としてミカン科に属する植物（例えば、レモン又はオレンジ等）を用いる場合には、カナマイシン耐性遺伝子〔A. Vardi等、プラント・サイエンス、第69巻、第199頁～第206頁（1990年）〕、又はカナマイシン耐性遺伝子若しくはハイグロマイシン耐性遺伝子〔T. Hidaka等、Japan. J. Breed., 第40巻、第199頁～第207頁（1990年）〕が特に好ましい。

【0029】パーティクルガン法などの直接導入法を用いて本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリンBカセットと選抜マーカ―遺伝子カセットとを、大腸菌で一般的に用いられる多コピープラスミド（例えば、pUC19）にクローン化し、植物細胞に導入することができる。その場合、クルクリンBカセットと選抜マーカ―遺伝子カセットとを、

（1）同一プラスミド上に保持させて導入することもできるし、あるいは（2）別々のプラスミド上に保持させ、それらのプラスミドを混合して導入する（いわゆる、コトランスフォーメーション）こともできる。コトランスフォーメーションにより本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリンBカセット及び選抜マーカ―遺伝子カセットの内、選抜マーカ―遺伝子カセットのみを保持するプラスミドとして、bar遺伝子がイネアクチンプロモーターとノパリンシンターゼターミネーターとの間に含まれているプラスミドpDM302〔R. Wu等、プラントセルレポート、第11巻、第586頁～第591頁（1992

年)] を使用し、別に調製したクルクリンBカセットを有するプラスミド、及び前記プラスミド pDM302 の2種類のプラスミドDNAを混合してコトランスフォームさせることができる。

【0030】また本発明で、アグロバクテリウムを介した導入法を用いて本発明のプラスミドで植物細胞を形質転換する場合には、例えば、クルクリンBカセットと選抜マーカ―遺伝子カセットとを同一プラスミド上に保持するアグロバクテリウム用のバイナリープラスミドを作成し、植物細胞に導入することができる。例えば、クル

クリンB又はクルクリンB類似体をコードするDNA (例えば、クルクリンB cDNA) を、カナマイシン耐性遺伝子を有するバイナリーベクター pBI121 のカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターとノパリンシンターゼターミネーターとの間にクローン化し、このバイナリープラスミドを有するアグロバクテリウムを植物細胞に感染させ、カナマイシン耐性能により選抜することによって、形質転換細胞を得ることができる。

【0031】このようにして得られた遺伝子を導入した細胞から、スクリーニングの上、任意の方法で植物体を再生させることができる。イネの場合は、例えば、遺伝子を導入した細胞を、選抜マーカ―に対応した選抜薬剤

(例えば、選抜マーカ―がビアラホス耐性遺伝子の場合には、ビアラホス10ppm) 及び植物ホルモンを含むN6培地に置き換え、適切に培養すると、4～8週間で遺伝子導入により形質転換した細胞(カルス)を得ることができる。得られたカルスを、適切な増殖培地(例えば、ビアラホス10ppm及び植物ホルモンを含むN6培地)に移し、更に、適切な再分化培地(例えば、ビアラホス10ppm及び植物ホルモンを含むMS培地)で培養すれば、形質転換したイネ植物を得ることができる。なお、細胞中のクルクリンB又はクルクリンB類似体の発現は、免疫学的に解析(例えば、ウエスタン解析)することで確認することができる。

【0032】このようにして得られた形質転換細胞又は形質転換植物から公知の方法により、クルクリンB又はクルクリンB類似体を抽出することができる。例えば、形質転換細胞、又は形質転換植物(全体又はその一部分)を破碎し、適切な洗浄液[例えば、50mM-Trisバッファー(pH7.0)、又は0.015N硫酸等]で洗浄し、水溶性タンパク質を除去する。沈殿物に適切な抽出液[例えば、0.5M-NaClを含む50mM-Trisバッファー(pH7.0)、又は0.05N硫酸等]を入れ、一晩振とう抽出し、クルクリンB又はクルクリンB類似体抽出液を得ることができる。この抽出液に70%飽和硫酸アンモニウムを添加し、遠心により沈殿を回収する。この沈殿を0.2M酢酸2.5mlに溶解し、脱塩用カラムPD10(ファルマシア社製)を用いて脱塩する。こうして得られたクルクリンB又はクルクリンB類似体タンパク質溶液を凍結乾燥する

ことにより、クルクリンB又はクルクリンB類似体を得ることができる。クルクリンB又はクルクリンB類似体抽出に使用することのできる前記形質転換植物は、クルクリンB又はクルクリンB類似体を含んでいれば特に限定されず、植物全体、又はその一部、例えば、葉、茎、地下茎、根、塊根、果肉、又は種子などを使用することができる。また、クルクリンB又はクルクリンB類似体の抽出のみが達成できれば十分である場合には、植物を再生させる必要はなく、プロトプラスト、又はカルス等の形質転換細胞をそのまま破碎等して、抽出することができる。

【0033】本発明による酸味抑制剤は、これに限定されるものではないが、例えば、酸味を示す化合物(例えば、アスコルビン酸又は酢酸など)を添加した飲食物、又はそれ自体酸味を示す飲食物に対して、酸味のみを低減又は無味化するのに有用である。例えば、酸化剤及び/又はビタミンC補強剤としてアスコルビン酸が添加されている飲食物(例えば、茶などの缶又は瓶入り飲料)に、本発明による酸味抑制剤を添加することにより、アスコルビン酸の酸味のみを低減することができる。また、防菌剤又は静菌剤として酢酸が添加されている飲食物(例えば、弁当、漬物、サラダ、又はパック米など)に、本発明による酸味抑制剤を添加することにより、アスコルビン酸の酸味のみを低減することができる。また、それ自体酸味を示す飲食物としては、例えば、果汁飲料を挙げることができ、それ自体酸味を示す飲食物に本発明の酸味抑制剤を添加することにより、酸味を調節することができる。

【0034】本発明の形質転換植物は、それ自体をそのまま食用とすることもできる。例えば、酸味のみが抑制されると付加価値が向上する作物[例えば、柑橘類(例えば、温州ミカン、ユズ、キンカン、グレープフルーツ、バレンシア、ザボン、ハッサク、レモン、イヨカン、バンペイユ、サンボウカン、ライム、又は夏ミカンなど)、キウイフルーツ、パイナップル、アセロラ、又はトマトなど]中で、クルクリンB又はクルクリンB類似体を発現させると、その植物が本来有する酸味のみを抑制した形質転換植物を得ることができる。また、作物それ自身は酸味を有していないが前述したようにアスコルビン酸又は酢酸などを添加した飲食物と同時に食する可能性のあるような作物中で、クルクリンB又はクルクリンB類似体を発現させることにより前述の酸味抑制剤と同様の効果を得ることができる。前記の各種の形質転換植物は、前記の公知方法を用いて作出することができる。

【0035】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】クルクリンB又はクルクリンB類似体遺

伝子発現用プラスミドの構築

まず、以下の手順で、シグナル配列及び延長配列を含む前駆体型クルクリンBをコードするcDNA、及びシグナル配列は含むが延長配列を欠失させた延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンBをコードするcDNAをPCR法により作成した。配列番号4で表わされる塩基配列からなるプライマーCURN1及び配列番号5で表わされる塩基配列からなるプライマーCURC4の2種類をプライマーとし、特開平6-189771号公報に記載のプラスミドpQ9を鋳型とし、増幅用酵素としてPfu

10

u-DNAポリメラーゼ（宝酒造）を用いてPCRを行った。なお、プラスミドpQ9は、特開平6-189771号公報の実施例1～10に記載の方法により調製した。すなわち、クルクリゴ・ラチフォリアの果実から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成し、クルクリンAのアミノ酸配列（特開平3-190899号公報に記載）から設計したプローブで選抜することによりプラスミドpQ9を得た。

【0036】増幅されたDNA断片を大腸菌ベクターpUC19（東洋紡製）のSmaI部位にクローン化した後、BamHI（東洋紡製）及びSacI（東洋紡製）の2重切断をし、クルクリンB cDNAを含むDNA断片を精製した。この断片をトウモロコシユビキチンプロモーター、トウモロコシユビキチンイントロン、及びノパリンシンターゼターミネーターを有するプラスミドpUBA [土岐等, プラント・フィジオロジー, 第100巻, 第1503頁～第1507頁（1992年）] のBamHI部位とSacI部位との間に存在するビアラホス耐性（bar）遺伝子と置換する形でサブクローニングし、プラスミドpMCU42を得た。pMCU42

30

は、シグナル配列及び延長配列を含む前駆体型クルクリ *

*ンB遺伝子を有していた。図1に、プラスミドpMCU42の構造を模式的に示す。図1において、「nos」はノパリンシンターゼを意味する。

【0037】同様に、前記プライマーCURN1及び配列番号6で表わされる塩基配列からなるプライマーCURC5の2種類のプライマーを用いて、前記のように、DNA断片を増幅し、pUC19のSmaI部位にクローン化した後、BamHI及びSacIで二重切断し、pUBAのBamHI部位とSacI部位との間に存在するビアラホス耐性（bar）遺伝子と置換する形でサブクローニングし、プラスミドpMCU43を得た。pMCU43は、シグナル配列は含むが延長配列を欠失させた延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンB遺伝子を有していた。図2に、プラスミドpMCU43の構造を模式的に示す。図2において、「nos」はノパリンシンターゼを意味する。

【0038】

【実施例2】 イネの形質転換

2-1. 完熟種子からの胚組織摘出

イネ品種日本晴の完熟種子を脱粒後、3.5%次亜塩素酸カルシューム溶液中で、脱気攪拌しながら殺菌を30分間行った。その後、滅菌水で充分洗浄してから、滅菌濾紙上で水分を除き、表1に示すカルス誘導培地Aに置床し、25℃暗所で培養した。培養6日後、肥大してきた胚組織のみを摘出した。摘出した組織は胚盤側を上にしてカルス誘導培地Aの入った6cmシャーレに並べた。並べ方は半径1cmの円周上に沿って10～20個並べてショット用シャーレとした。

【0039】

【表1】

	カルス誘導培地A	カルス誘導培地B	再分化培地
基本塩類組成	N6	N6	MS
ビタミン	添加	添加	添加せず
シュクロース (g/l)	20	20	10
ソルビトール (g/l)	0	0	50
2, 4-D (ppm)	3	3	0
NAA (ppm)	0	0	0.5
カイネチン (ppm)	0	0	0.5
ジュランガム (g/l)	4	4	4
ビアラホス (ppm)	0	10	10
pH	5.8	5.8	5.8

（表中、基本塩類組成の欄に示す「N6」は、463mg/l-(NH₄)₂SO₄、2830mg/l-KNO₃、400mg/l-KH₂PO₄、1.6mg/l-H₃BO₃、4.4mg/l-MnSO₄・4H

50

2O、1.5mg/l-ZnSO₄・7H₂O、0.8mg/l-KI、166mg/l-CaCl₂・2H₂O、185mg/l-MgSO₄・7H₂O、37.3mg/l-Na₂-EDTA、及び27.8mg/l-

FeSO₄・7H₂Oを意味し、基本塩類組成の欄に示す「MS」は、1650mg/l-NH₄NO₃、1900mg/l-KNO₃、170mg/l-KH₂PO₄、6.2mg/l-H₃BO₃、22.3mg/l-MnSO₄・4H₂O、8.6mg/l-ZnSO₄・7H₂O、0.83mg/l-KI、0.25mg/l-Na₂MoO₄・2H₂O、0.025mg/l-CuSO₄・5H₂O、0.025mg/l-CoCl₂・6H₂O、440mg/l-CaCl₂・2H₂O、370mg/l-MgSO₄・7H₂O、37.3mg/l-Na₂-EDTA、及び27.8mg/l-FeSO₄・7H₂Oを意味し、「ビタミン」は、0.5mg/lニコチン酸、0.5mg/lピリドキシン塩酸、1mg/lチアミン塩酸、及び2mg/lグリシンを意味し、「2,4-D」は2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を意味し、「NAA」はナフタレン酢酸を意味する)

【0040】2-2. パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガン装置は、空気圧式のレーボック商工モデル260を用いた。実施例1で構築したプラスミドpMCU42又はpMCU43と、ビアラホス耐性遺伝子を有するpDM302[R. Wu等, プラントセルレポート, 第11巻, 第586頁~第591頁(1992年)]とを1:1に混合したDNA液16μlを、森川らの方法[植物細胞工学, 第4巻, 第43頁~第48頁(1992年)]に準じて、1ミクロン金粒子にコーティングし、専用プロジェクタイル(弾)に乗せ、自然乾燥した。1弾当たり0.1mg金粒子及び0.4μgDNAを含む弾を、ショット用シャーレに2弾ショットして(発射圧力=ポンピング8回、試料間距離=6cm)、2種類の遺伝子を導入した。

【0041】2-3. 形質転換カルスの選択培養及び植物体への再分化

前記実施例2-2でショットしたシャーレより胚組織を、選択薬剤ビアラホス10ppmを更に含む、表1に示すカルス誘導培地Bに置き換え、25℃暗所で7日間培養した後、明所(3000lux)で培養を継続した。培養4~8週間で遺伝子導入によるビアラホス耐性カルスを胚盤上に確認して、カルス部分を切り出し、カルス誘導培地Bで増殖培養し、pMCU42で形質転換されたイネ由来のカルスMCU42-15と、pMCU43で形質転換されたイネ由来のカルスMCU43-46とを得た。このカルスを表1に示す再分化培地に移植し、25℃、明所(3000lux)で4~8週間培養し、再分化個体を得た。

【0042】

【実施例3】 ウェスタン解析によるクルクリンBタンパク質の検出

それぞれの形質転換カルス系統についてウェスタン解析を行い、クルクリンB発現を調べた。カルスからのタン

パク質試料の抽出は、カルス0.1gに50mMトリス-塩酸(pH7.0)200μlと海砂とを加え、ハンドホモゲナイザーで抽出した。得られた抽出液を12,000rpmで10分間遠心し、その上澄液をタンパク質濃度測定して試料とした。1ウェルあたりタンパク質50μgの量の試料を15-25%グラジエントSDSポリアクリルアミドゲル(第一化学, マルチゲル)電気泳動で展開し、PVDF膜に転写した後、ウサギ抗クルクリンB血清を一次抗体に、HRP標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体にして、反応するバンドをコニカ発色キット(コニカ社)で、免疫化学的に検出した。

【0043】その結果を図3に示す。レーン1は、プラスミドpMCU42による形質転換カルスMCU42-15の結果を、レーン2は、プラスミドpMCU43による形質転換カルスのMCU43-46の結果を、レーン3は、コントロールとしての非形質転換カルス(イネ品種=日本晴)の結果を、レーン4は天然クルクリンの結果をそれぞれ示す。形質転換カルス試料では天然クルクリンとほぼ同じ位置にバンドが検出され、イネカルスでのクルクリンBタンパク質の発現を確認した。非形質転換カルスには、反応するバンドは認められなかった。

【0044】

【実施例4】 組換えクルクリンBの精製とN末端アミノ酸配列の決定

実施例2で得られたイネカルスMCU43-46の40gを乳鉢と乳棒を用いて破碎し、50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)80mlで抽出し、遠心後の上清を捨て、水溶性タンパク質を除去した。カルス沈殿物に0.5M-NaClを含む50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)80mlを入れ、一晚振とう抽出し、遠心によりクルクリン抽出液を得た。この抽出液に70%飽和硫酸アンモニウムを添加し、遠心により沈殿を回収した。この沈殿を0.2M酢酸2.5mlに溶解し、脱塩用カラムPD10(ファルマシア社製)を用いて脱塩した。こうして得られたクルクリンBタンパク質を含む粗精製画分を凍結乾燥し、0.5M-NaClを含む50mM-Tris-塩酸バッファー(pH7.0)3mlに溶解した。この溶液の一部を15%ゲル(第一化学社製, マルチゲル)のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離後、PVDF膜に電氣的にブロットした。この膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、その後、50%メタノールで脱染した。目的とするタンパク質バンドの部分を切り出し、プロテインシークエンサー(島津PPSQ10)によりN末端アミノ酸配列を決定したところ、N末端から第10番目までのアミノ酸配列が、配列表の配列番号7で表わされるアミノ酸配列であることが判明した。このアミノ酸配列は、導入したcDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列と完全に一致した。

【0045】

【実施例5】 粗精製組換えクルクリンBの官能試験
前記実施例2で得られたイネカルスMCU43-46又はイネカルスMCU42-15各40gから、前記実施例4に記載の方法に従って、クルクリンBタンパク質を含む粗精製画分を得た。また、コントロールとして、非形質転換カルス（イネ品種＝日本晴）40gから、同様にして粗精製画分を得た。これらの粗精製画分を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物各25mgを水12mlに溶解し、クルクリンBタンパク質含有サンプル2種類と、コントロールサンプル1種類を得た。得られたサンプル

10

を以下の官能試験に使用した。
【0046】官能試験は以下に示す手順で実施した。すなわち、はじめに、0.1Mクエン酸水溶液3mlを口の中に含み、酸味の基準レベルを記憶した。次に、口中を水で強く3回すすぎ、酸味が全く感じられない状態にした。続いて、前記のクルクリンBタンパク質含有サンプル又はコントロールサンプル3mlを口中に3分間含み、その後、それを吐き出した。口中を水で軽く1回すすいだ後に、再度、0.1Mクエン酸水溶液3mlを口の中に含み、その際に感じる酸味と、前記の基準レベルの*

配列

Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Asp	His	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Cys	Asn	Leu	Val
			20					25					30		
Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Ser	Asn	Thr	Asp	Arg	Arg
		35				40					45				
Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Ile
	50					55				60					
Tyr	Asp	His	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Trp	Gly	Ser	Ala	Cys	Trp	Gly	Asp
65				70					75					80	
Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe	Val	Ile
			85					90				95			
Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Trp	Ser	Leu	Gly	Pro	Asn	Gly	Cys	Arg	Arg	Val
			100					105				110			
Asn	Gly														

【0050】配列番号：2

配列の長さ：158

配列の型：アミノ酸

配列

Met	Ala	Ala	Lys	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Val
		-20					-15					-10			
Ala	Ser	Leu	Gly	Met	Ala	Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu
		-5			1					5				10	
His	Ala	Asp	His	Ser	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln
			15					20				25			
Asn	Lys	Cys	Asn	Leu	Val	Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala
		30						35				40			
Ser	Asn	Thr	Asp	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser
			45				50					55			

* 酸味との差異を比較した。その結果、コントロールサンプルの場合には、酸味のレベルに差異が認められなかったのに対して、クルクリンBタンパク質含有サンプルの場合には、クエン酸の酸味が感じられなかった。

【0047】

【発明の効果】本発明によれば、食品用として好適なクルクリンB又はクルクリンB類似体を大量に生産することが可能である。また、本発明の酸味抑制剤によれば、酸味を示す化合物（例えば、アスコルビン酸又は酢酸など）を添加した飲食物、又はそれ自体酸味を示す飲食物に対して、酸味のみを低減するのに有用である。

【0048】

【配列表】

【0049】配列番号：1

配列の長さ：114

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源：生物名：クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia)

※配列の種類：タンパク質

起源：生物名：クルクリゴ・ラチフォリア (Curculigo latifolia)

※

19
 Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Trp Gly
 60 65 70
 Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys
 75 80 85 90
 Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro
 95 100 105
 Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala Lys Asp Ser
 110 115 120
 Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn Asn
 125 130 135

20

【 0 0 5 1 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 1 1 6 6

* 配列の型 : 核酸

* 配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

CGCAAAGACA ATG GCG GCC AAG TTT CTT CTC ACC ATT CTT GTC ACC TTT 49
 Met Ala Ala Lys Phe Leu Leu Thr Ile Leu Val Thr Phe
 -20 -15 -10
 GCG GCC GTC GCT AGC CTT GGC ATG GCC GAC AAT GTC CTG CTC TCC GGG 97
 Ala Ala Val Ala Ser Leu Gly Met Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly
 -5 1 5
 CAA ACT CTG CAT GCC GAC CAC TCT CTC CAG GCG GGC GCC TAT ACC TTA 145
 Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu
 10 15 20
 ACC ATA CAA AAC AAG TGC AAC CTG GTG AAA TAC CAG AAC GGG AGG CAG 193
 Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln
 25 30 35
 ATC TGG GCT AGC AAC ACT GAC AGG CGG GGC TCC GGC TGC CGC CTC ACA 241
 Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr
 40 45 50 55
 TTG CTG AGT GAC GGG AAC CTC GTT ATC TAC GAC CAC AAC AAC AAC GAC 289
 Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp
 60 65 70
 GTG TGG GGG AGC GCC TGC TGG GGG GAC AAC GGC AAG TAT GCT CTT GTT 337
 Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val
 75 80 85
 CTT CAG AAG GAT GGC AGA TTT GTC ATC TAT GGC CCG GTT TTG TGG TCC 385
 Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser
 90 95 100
 CTT GGC CCT AAT GGG TGC CGC CGT GTT AAT GGT GGA ATC ACA GTT GCT 433
 Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly Gly Ile Thr Val Ala
 105 110 115
 AAG GAT TCT ACT GAA CCA CAA CAT GAG GAT ATT AAG ATG GTG ATT AAT 481
 Lys Asp Ser Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn
 120 125 130 135
 AAT
 Asn
 136
 TAATCAAGTG AGAGGATTGT TATGAGAATA ATGAGTGGAA TGGAAGACCA ATCTCATGTC 544
 GGTGTGGCCT ATCTCCACCT GTTTGCAGTG CCTTTGTAA AATAACACAT TGGGGAATAA 604
 TAAAGTGAAG CTATATAGAT TGGTTCAGCA AATTTTCTGT TCAGTTTTCC TCTCACATGT 664
 CAATGTCGAT TTTTGGCCGC GGATCATACA TGTGCTTGGT ATTCTAATCG ATAGAATTAT 724

21

22

GGCTCAAATG GAGGCAGGGA TTATGAGAGT TTATTCGCAT CTCCGGGTCT TCCAACCTTAC 784
 GAATTATAAC AAGATTCAAG GATGCATCTG AGAGCCAACT TAACGTCTTA CATCAAAGGA 844
 GCTAGCCGAA GTTTATTCCC AGAGCTAGAG GAAGTTCGCT GCCATGGTTG ATAGTACAAG 904
 TAGAACGACG CATGTATTGC TTCCAGGAAT CACTTCCAGC TTCTCGACAC CTCCAGTGGC 964
 CTTTTCACCA CCGAAAGCAC CACCAATTTT AGCACCATTG GTAGGTATAT TTACATTAAC 1024
 AATACCACAG TCACTGCCAT GGGGTCCAAT CCACTTGAAA ATAACCTCAG GTCTACGAGT 1084
 GAAAATAGAA CTGCTTAAAC TTGCGGTACA GAGTTATTTA TTTCAATTGC TTCTTTCAGA 1144
 GTCTGGAATT TCATTACGTA AA 1166

【0052】配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGATCCACCA TGGCGGCCAA GTTTCTTCT

【0053】配列番号：5

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GAGCTCCTAT TAATTATTAA TCACCATCT

【0054】配列番号：6

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GAGCTCCTAT TAACCATTAA CACGGCGGC

【0055】配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu

1

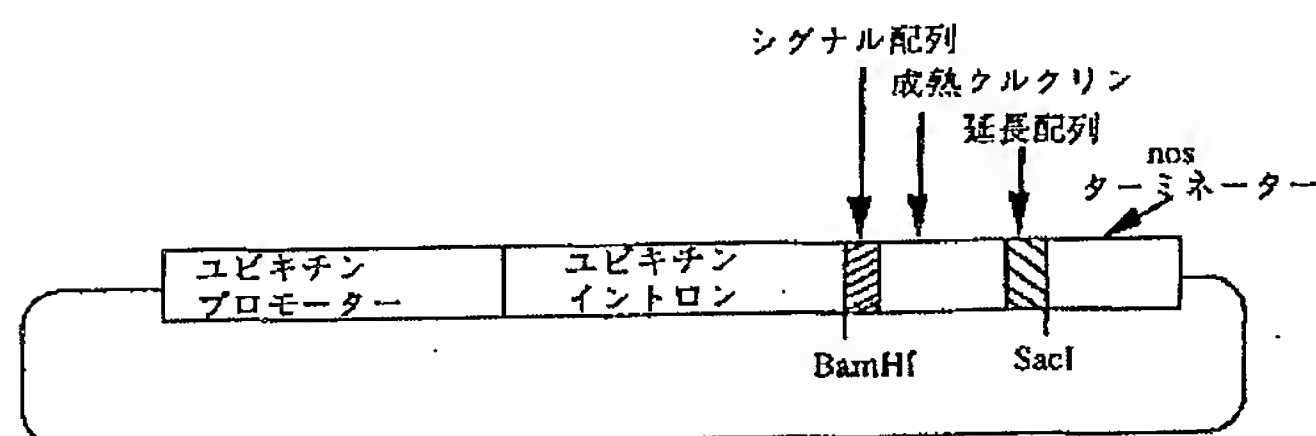
5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 トウモロコシユビキチンプロモーター及びイントロン下流に、シグナル配列、成熟体型クルクリンB、及び延長配列よりなる前駆体型クルクリンB cDNAを連結し、更にその下流にノパリンシンターゼターミネー☆

【図1】



pMCU42

※トポロジー：直鎖状

10 アンチセンス：No

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

*

※トポロジー：直鎖状

アンチセンス：Yes

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

※

★トポロジー：直鎖状

アンチセンス：Yes

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

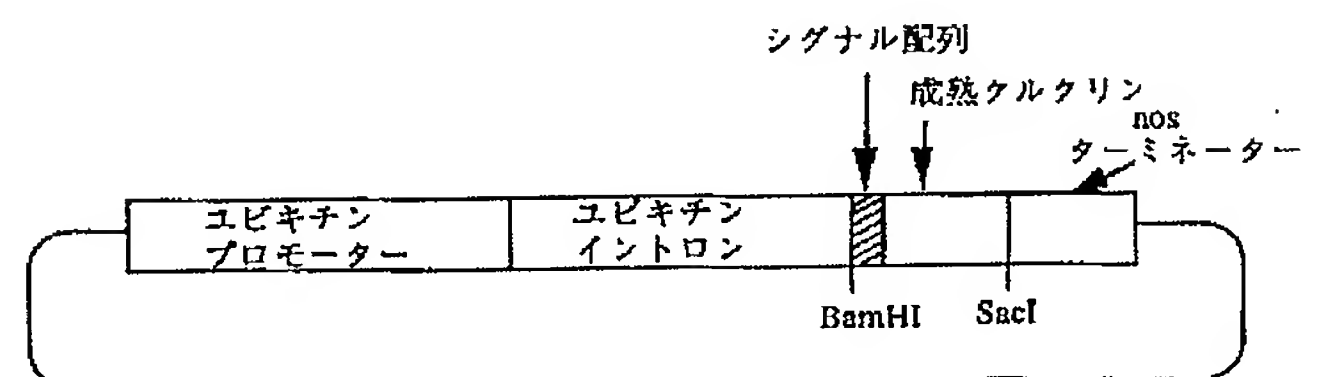
★

☆ターを連結したプラスミドpMCU42の構造を模式的に示す説明図である。

【図2】 トウモロコシユビキチンプロモーター及びイントロン下流に、シグナル配列及び成熟体型クルクリンBよりなる延長ペプチド欠失-前駆体型クルクリンB cDNAを連結し、更にその下流にノパリンシンターゼターミネーターを連結したプラスミドpMCU43の構造を模式的に示す説明図である。

【図3】 ウェスタン解析により検出した、イネカルスにおいて発現した組換えクルクリンBの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

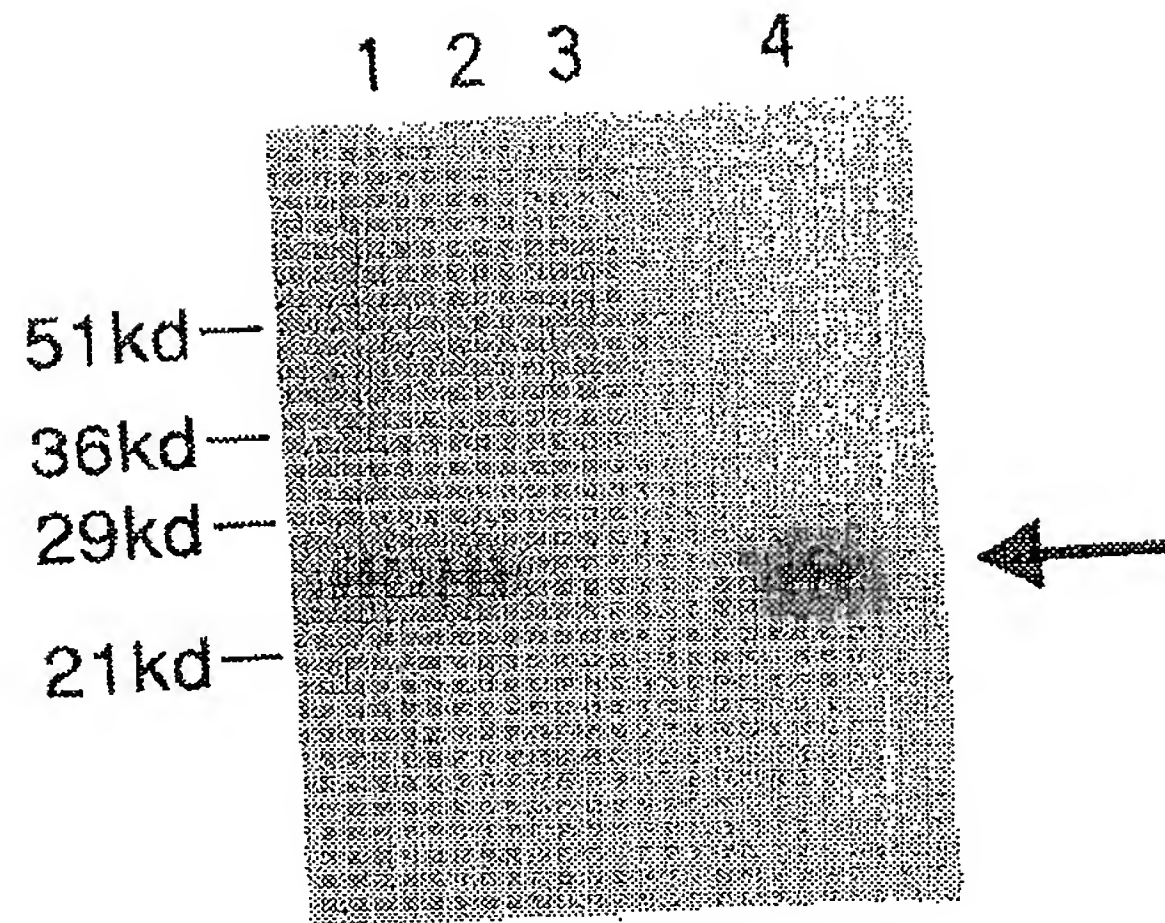
【図2】



pMCU43

【図3】

図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号
C 0 7 K 14/415	
C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A
C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 N 5/10	
C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 P 21/02	
C 1 2 R 1:91)	

F I	
C 0 7 K 14/415	
C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/00	C

(72) 発明者 栗原 良枝
東京都世田谷区奥沢 7-4-7

(72) 発明者 荒井 綜一
神奈川県横浜市神奈川区七島町38

(72) 発明者 安西 弘行
神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明
治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72) 発明者 勝俣 和子
神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明
治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72) 発明者 山下 治之
東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番35号 旭電
化工業株式会社内

(72) 発明者 杉山 宏
東京都荒川区東尾久 7 丁目 2 番35号 旭電
化工業株式会社内



US005395921A

United States Patent [19]**Kurihara**[11] **Patent Number:** **5,395,921**[45] **Date of Patent:** **Mar. 7, 1995**[54] **CURCULIN C**[75] **Inventor:** **Yoshie Kurihara, Tokyo, Japan**[73] **Assignees:** **Yoshie Kurihara; Asahi Denka Kogyo Kabushiki Kaisha, both of Tokyo, Japan**[21] **Appl. No.:** **165,754**[22] **Filed:** **Dec. 10, 1993****Related U.S. Application Data**

[63] Continuation of Ser. No. 934,722, Aug. 24, 1992, abandoned.

[30] **Foreign Application Priority Data**

Oct. 1, 1991 [JP] Japan 3-253914

[51] **Int. Cl.⁶** **A61K 37/02; C07K 15/10**[52] **U.S. Cl.** **530/350; 530/324**[58] **Field of Search** **530/350, 324**[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

5,176,937	1/1993	Kurihara et al.	426/655
5,178,899	1/1993	Kurihara et al.	426/655
5,178,900	1/1993	Kurihara et al.	426/655
5,242,693	9/1993	Kurihara et al.	426/3

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

2-104263	4/1990	Japan .
3-190899	8/1991	Japan .

OTHER PUBLICATIONS

Biotechnology Products Catalog, Pharmacia, pp. 50-52, 57 and 73, 1993.

Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, Sigma Chem. Co., pp. 1 595-1596, 1993.

Harris & Angal, "Protein Purification Methods," IRL Press, pp. 179-182, 203-207, 1989.

Primary Examiner—Michael G. Wityshyn*Assistant Examiner*—C. Sayala*Attorney, Agent, or Firm*—Frishauf, Holtz, Goodman & Woodward[57] **ABSTRACT**

Curculin C of the present invention has an intrachain disulfide linkage formed between the 29th cysteine residue and the 52nd cysteine residue and interchain disulfide linkages formed between the 77th cysteine residues of two curculin C monomer chains and between the 109th cysteine residues of two curculin C monomer chains, thus giving a dimer, and the monomer has an amino acid sequence as specified in SEQ ID No: 1.

1 Claim, 11 Drawing Sheets

FIG. 1

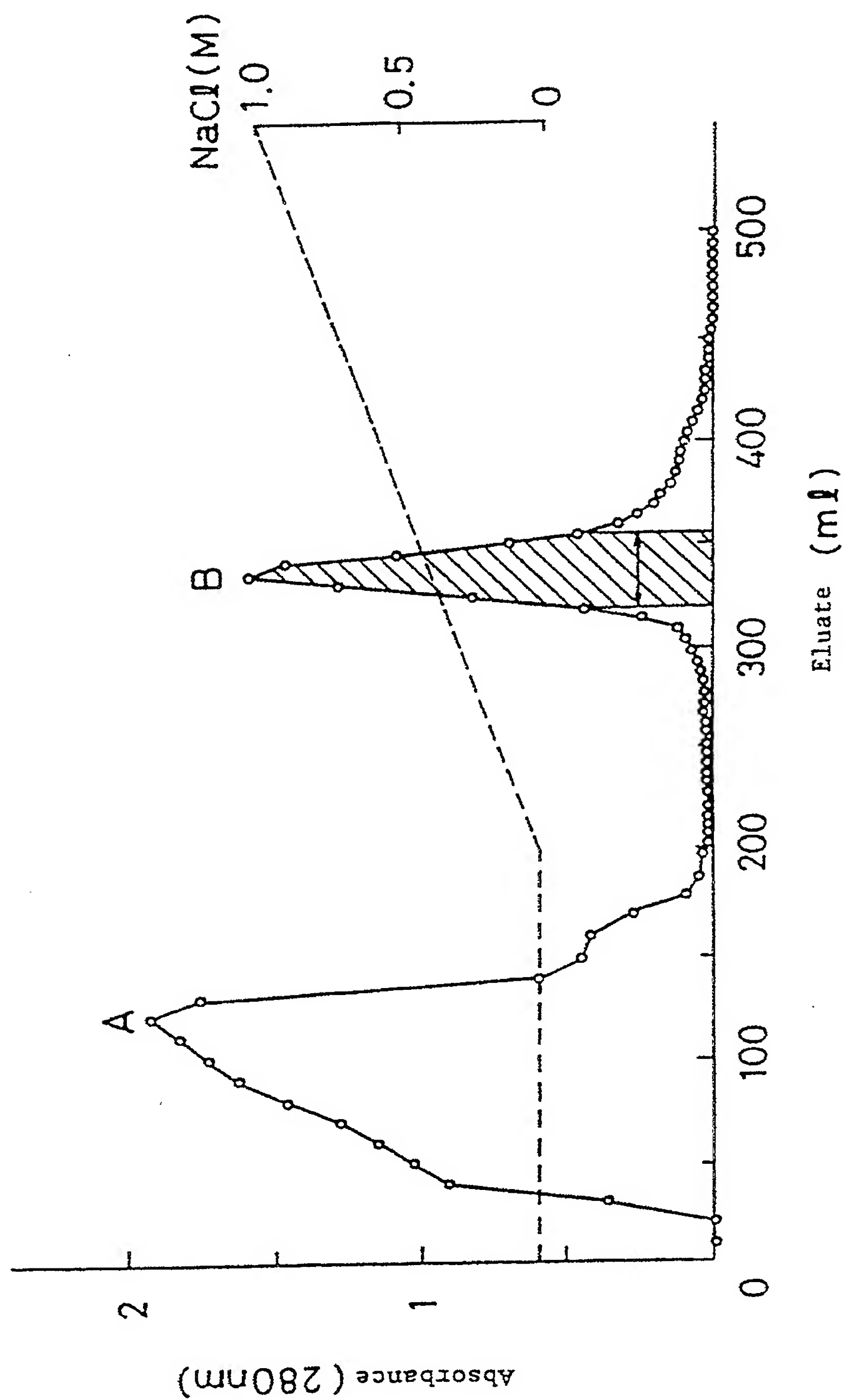


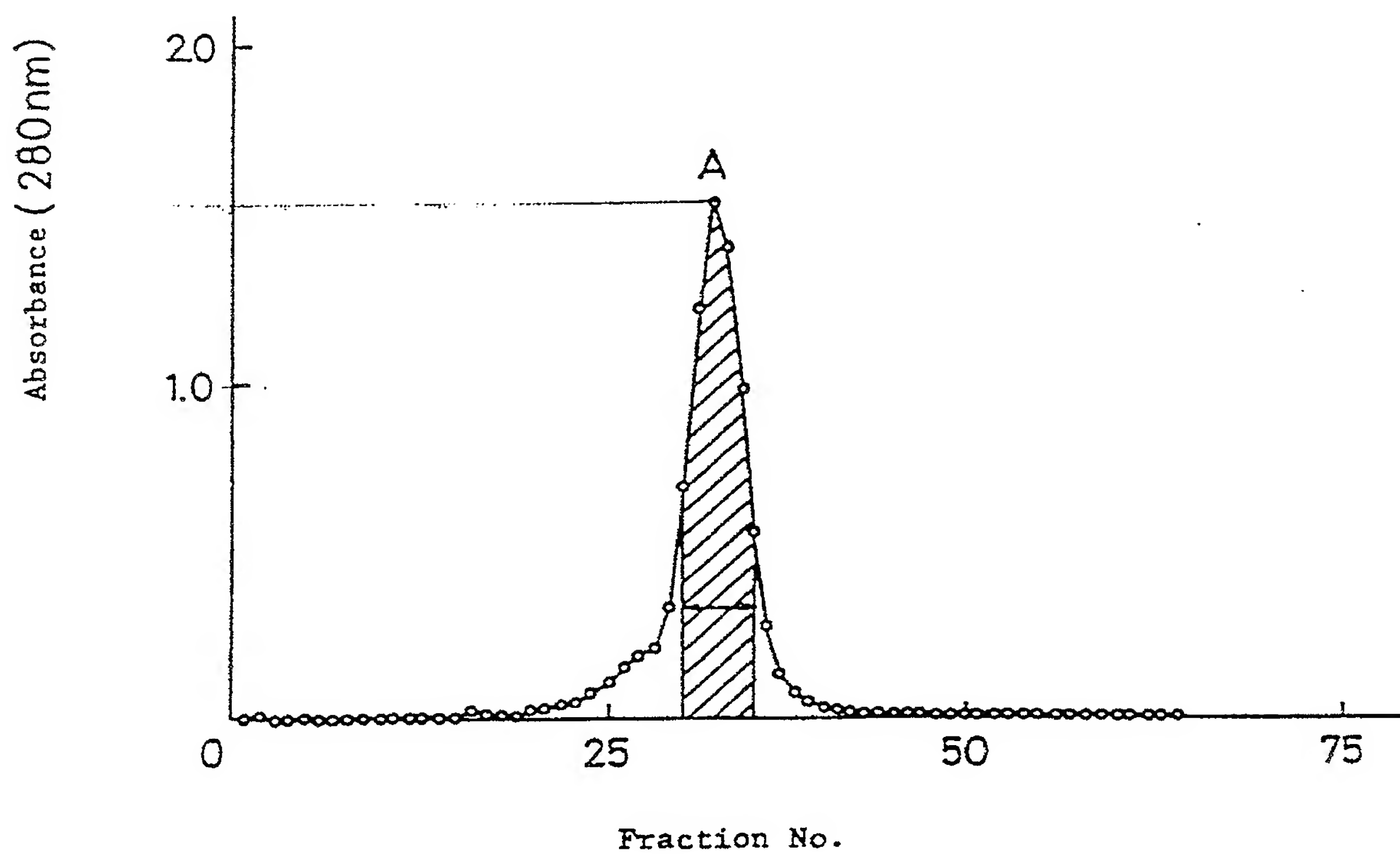
FIG. 2

FIG. 3

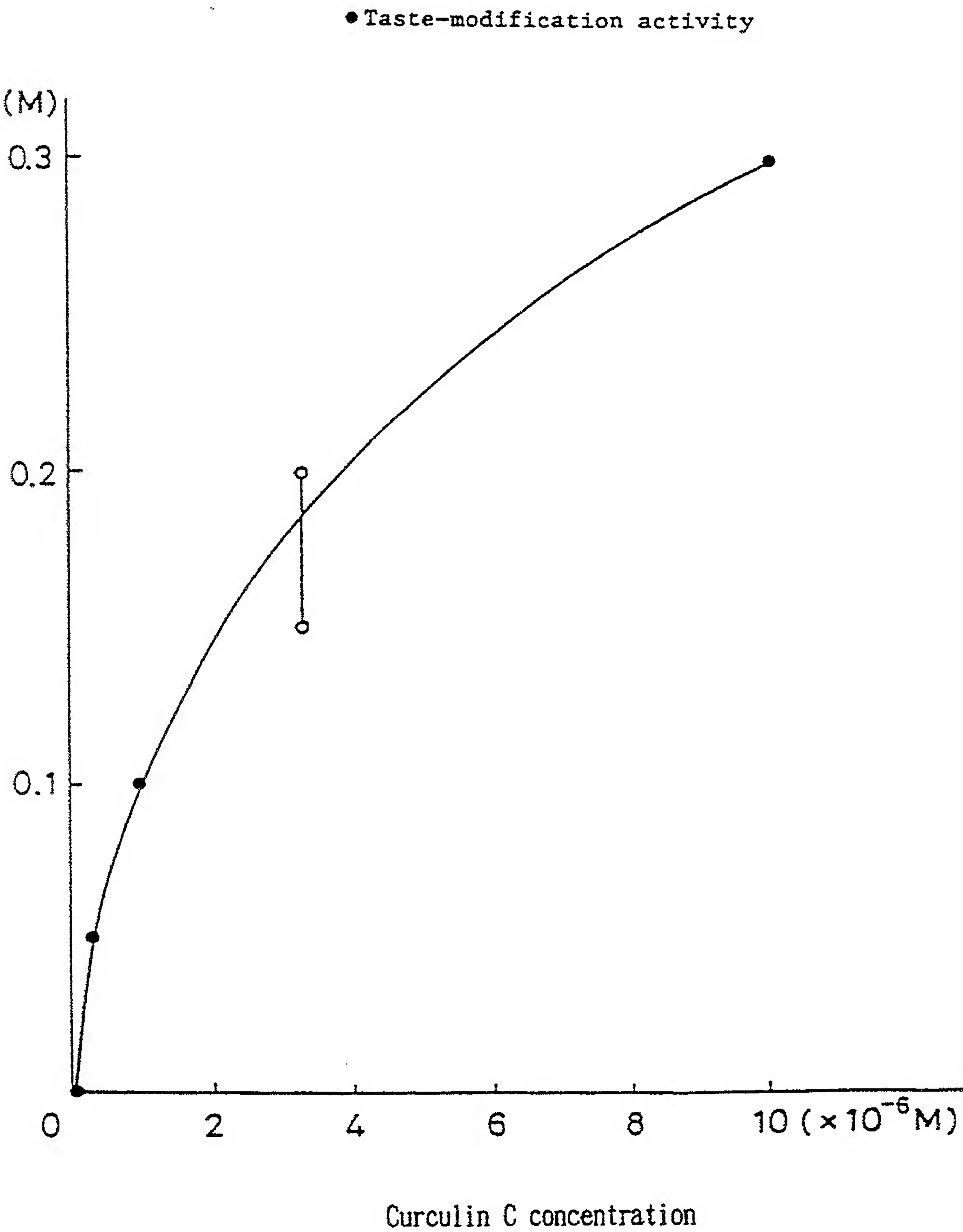


FIG. 4

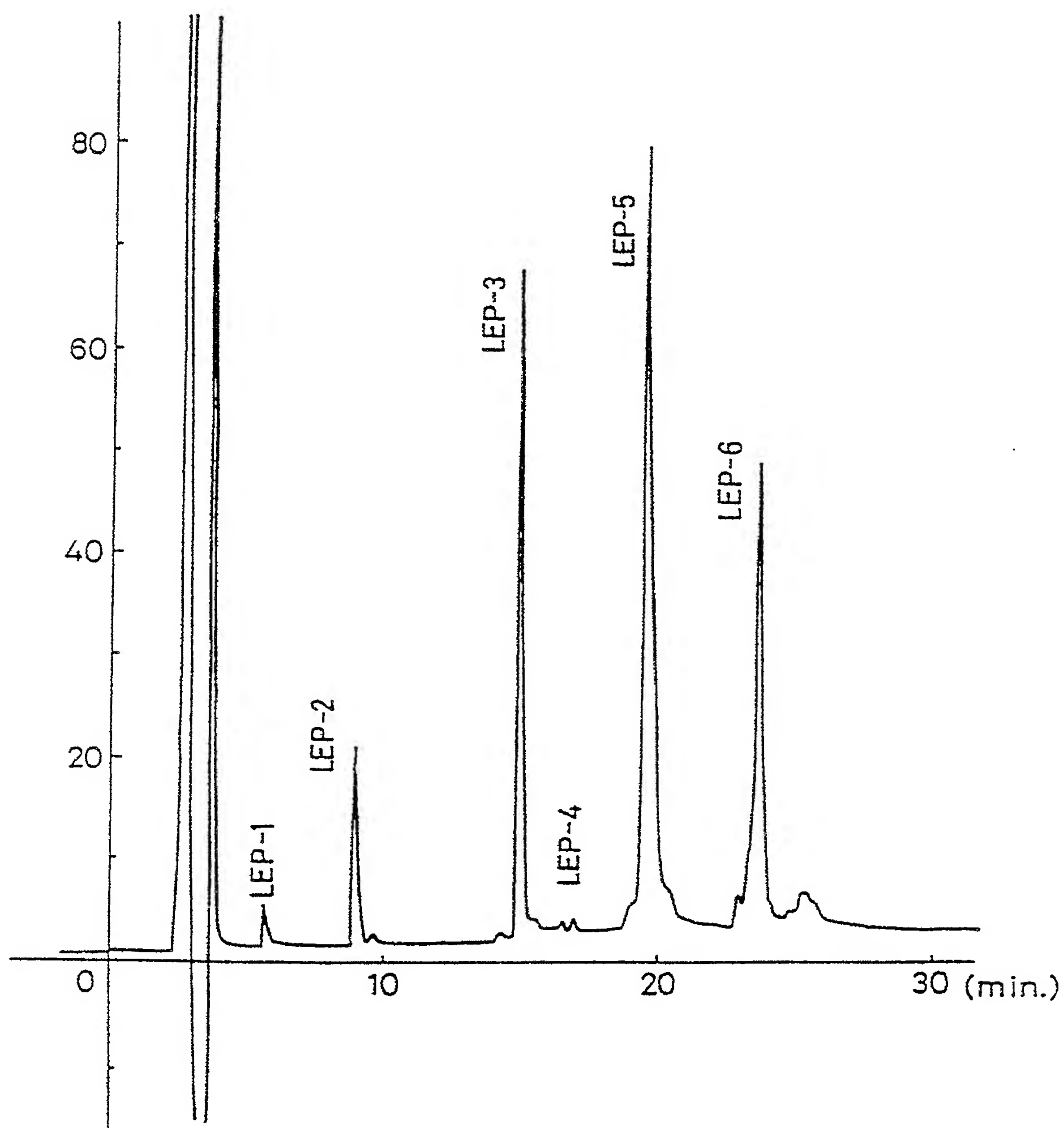


FIG. 5

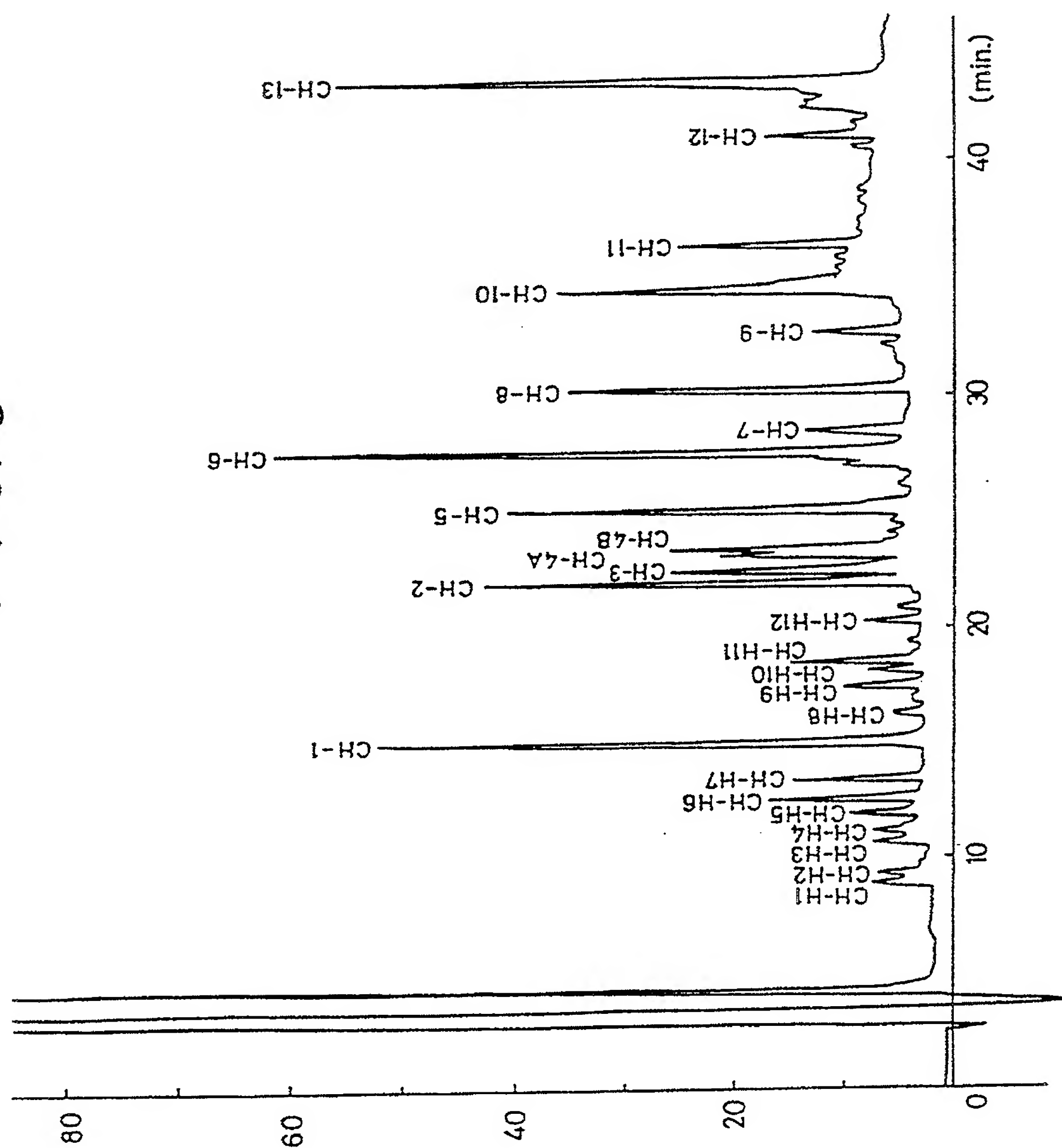


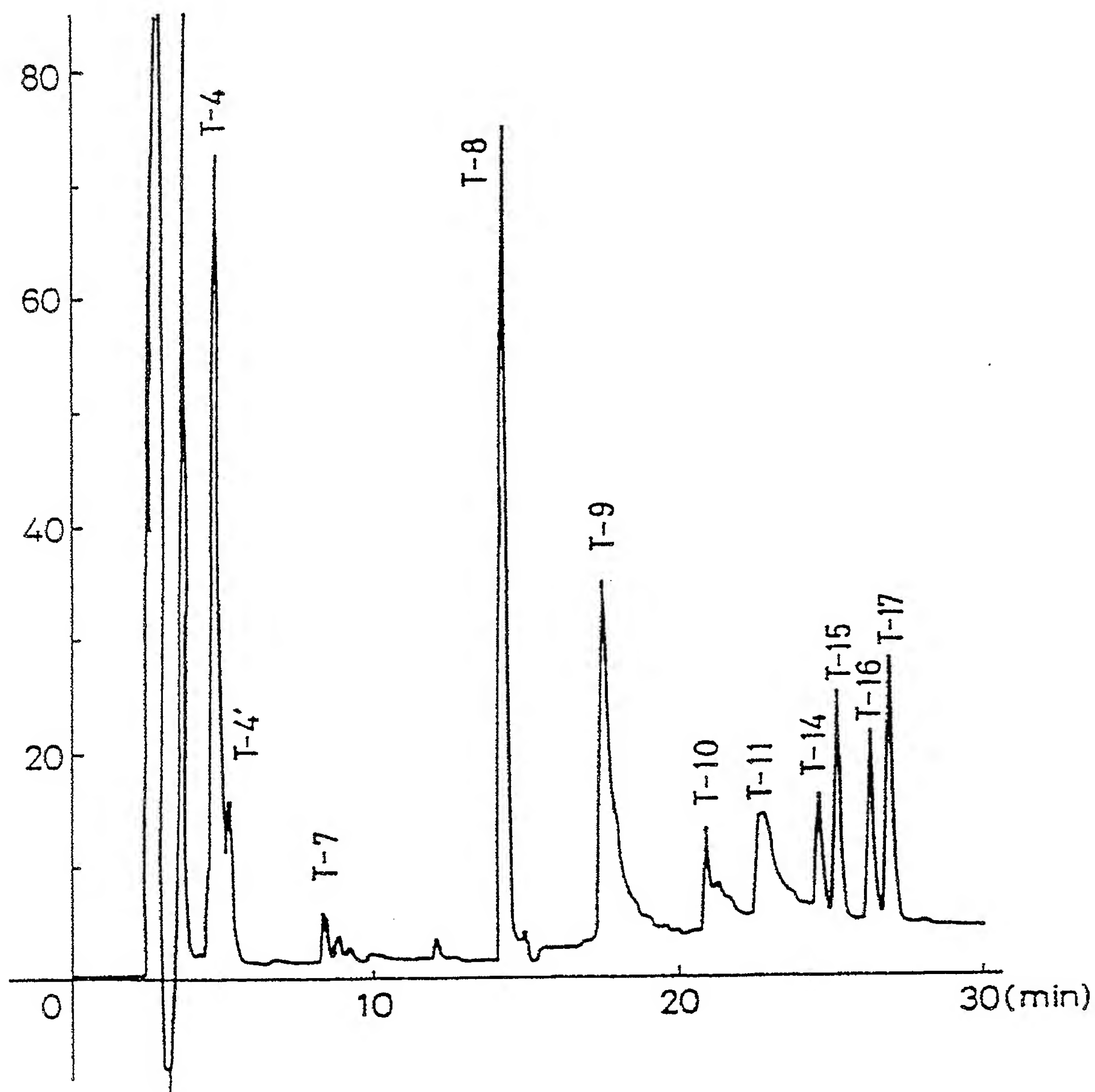
FIG. 6

FIG. 7

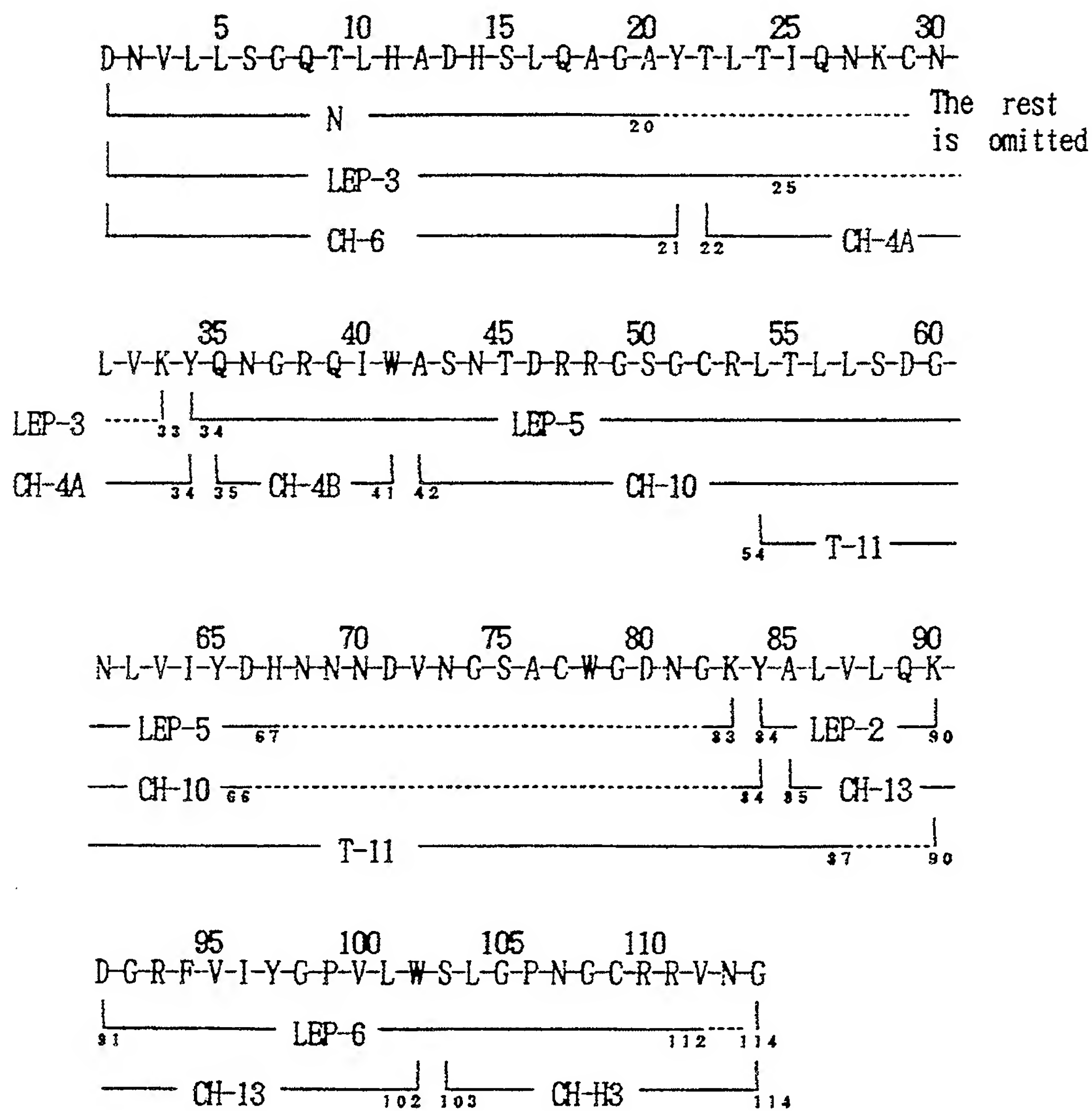
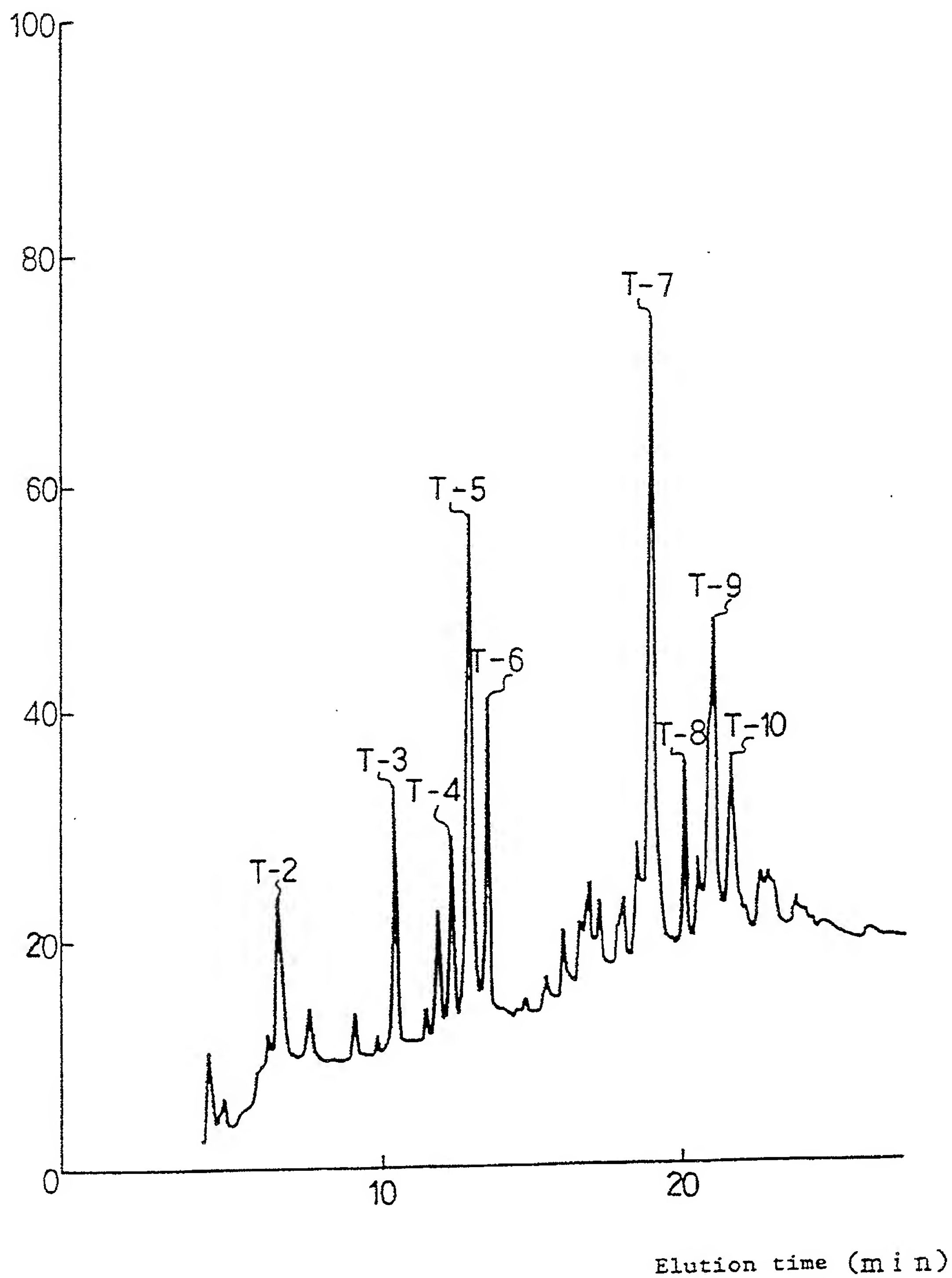


FIG. 8

Absorbance



Absorbance

FIG. 9

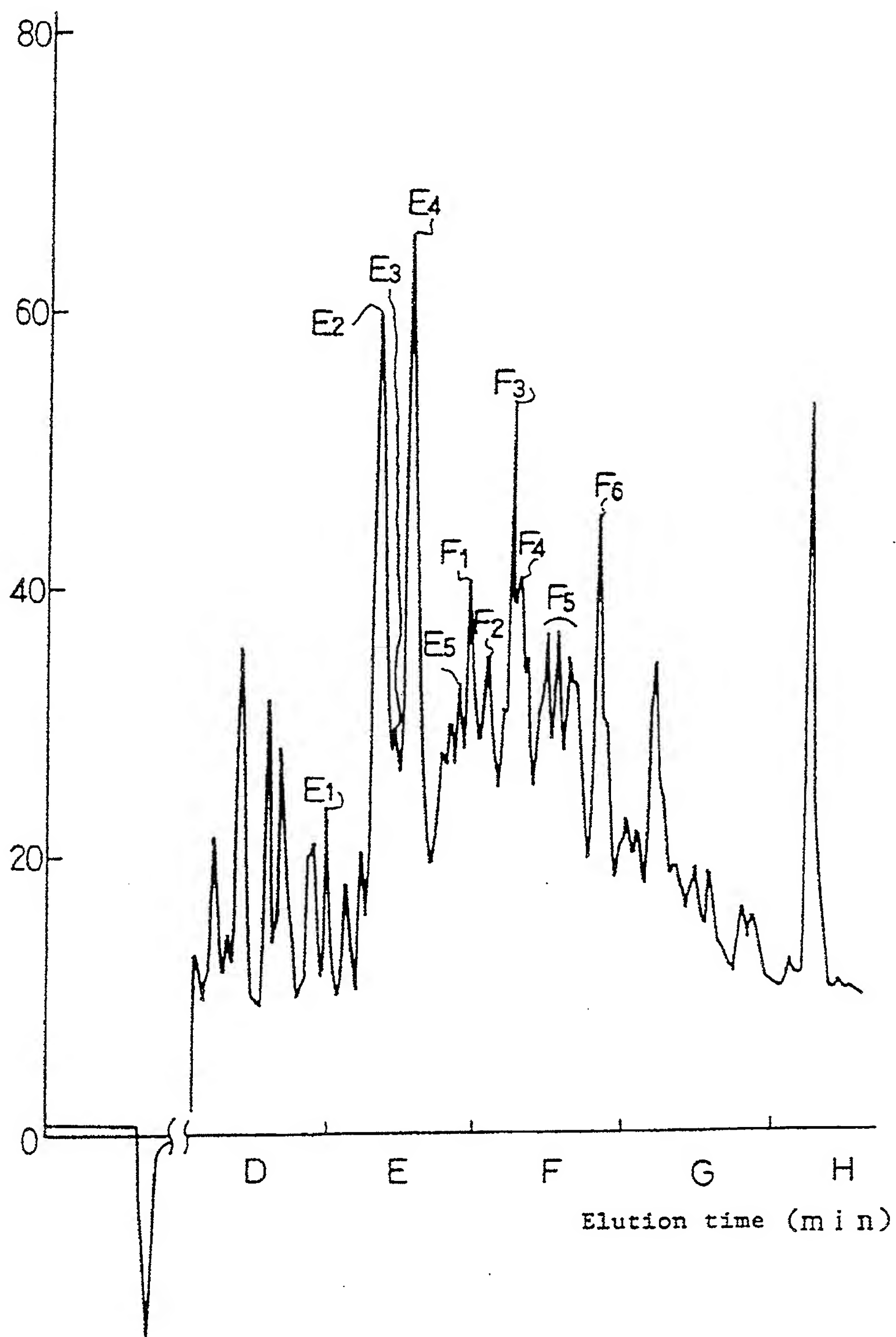
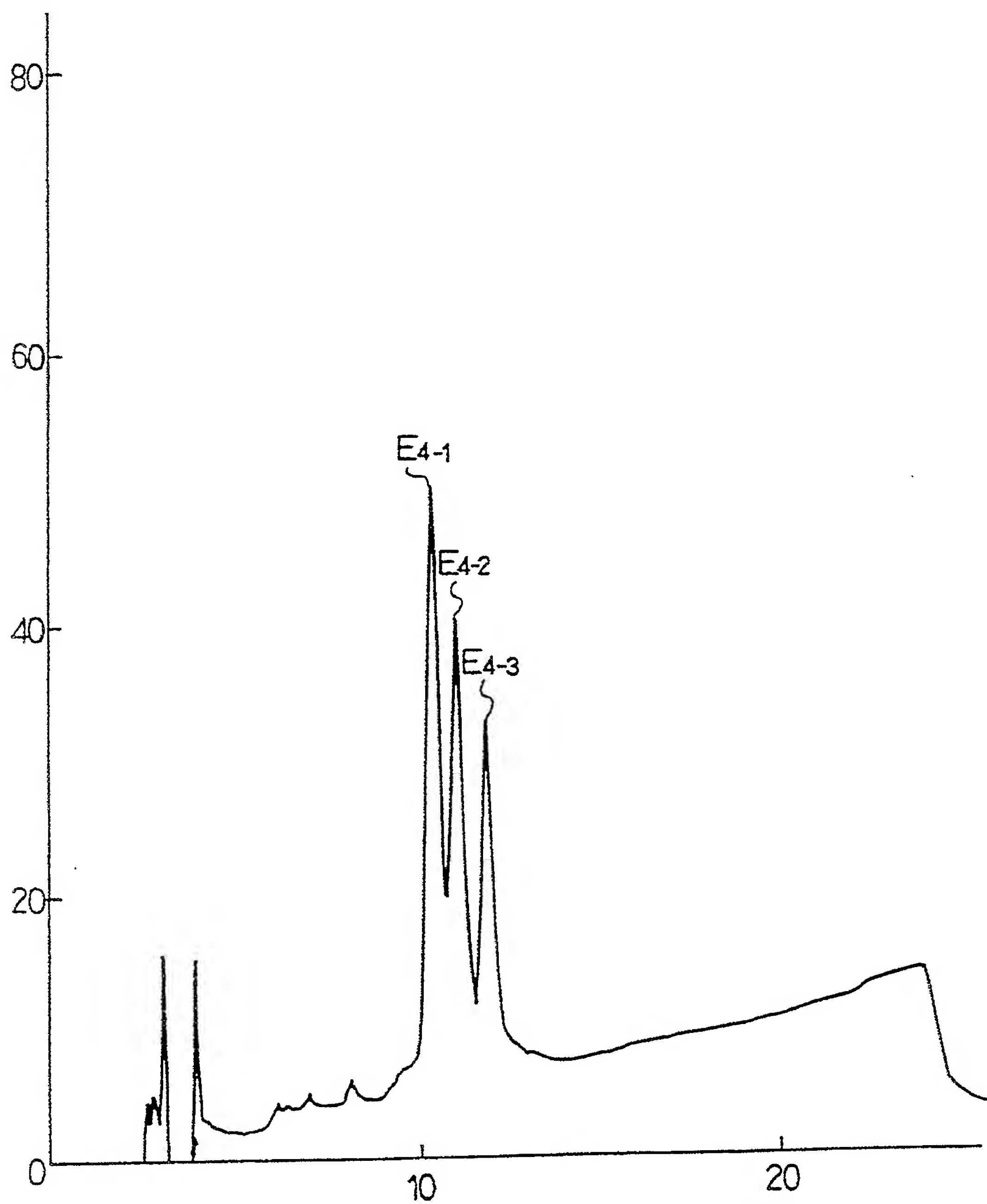


FIG. 10

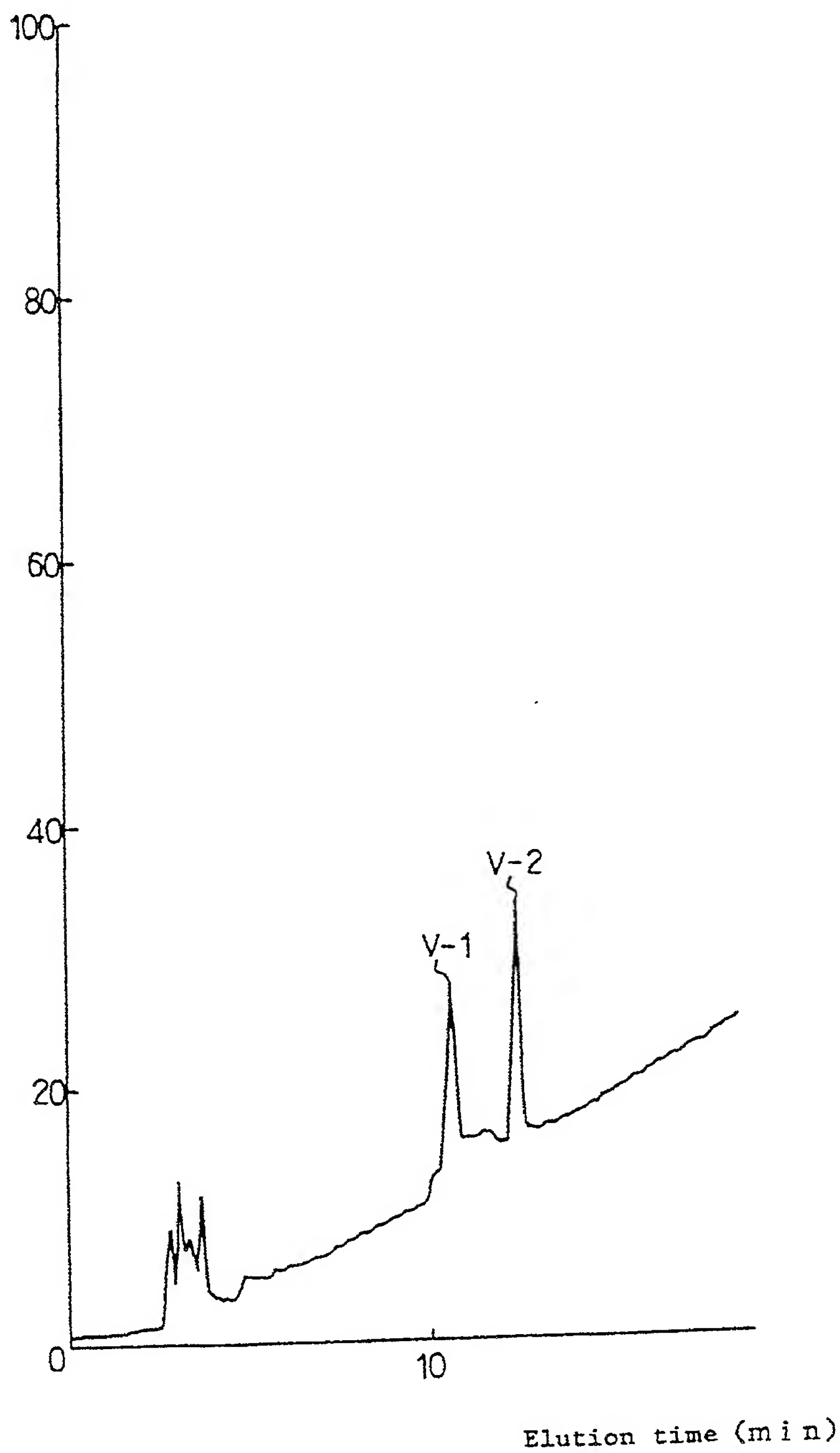
Absorbance



Elution time (min)

FIG. 11

Absorbance



CURCULIN C

This application is a continuation of application Ser. No. 07/934,722, filed Aug. 24, 1992, (abandoned).

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

This invention relates to curculin C (one of curculin homologue) having a stable and potent taste-modification effect, which is obtained from *Curculigo latifolia*.

2. Description of the Prior Art

The present inventors formerly found out a substance serving as a taste-modifier, which was named "curculin (curculin homologue, hereinafter referred to as curculin)" by them, from *Curculigo latifolia* fruits growing in Western Malaysia and the southern part of Thailand and belonging to the genus *Curculigo* of the family Hypoxidaceae or Amaryllidaceae. Further, they found out that this curculin was a protein and that a sour material or water taken after eating it would taste sweet, and applied for a patent based on these findings (refer to Japanese Patent Laid-Open No. 104263/1990.) Subsequently, they succeeded in highly purifying this protein curculin (one of curculin homologue, hereinafter referred to as curculin A) and applied for a patent on a taste-modifier having the amino acid sequence thereof (refer to Japanese Patent Laid-Open No. 190899/1991).

In spite of the accomplishment of these inventions, however, it has been desired to develop a substance having a more stable and potent taste-modification activity.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide curculin C having a stable and potent taste-modification activity which has a novel amino acid sequence and occurs as a dimer.

In the curculin C of the present invention, an intrachain disulfide linkage is formed between the 29th cysteine residue and the 52nd cysteine residue, while interchain disulfide linkages are formed between the 77th cysteine residues of two curculin C monomer chains and between the 109th cysteine residues of two curculin C monomer chains, thus giving a dimer, and the monomer has an amino acid sequence as specified in the following sequence list:

Sequence list:

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser 15
Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn 30
Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile Trp Ala Ser Asn Thr 45
Asp Arg Arg Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly 60
Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn Asp Val Asn Gly Ser 75
Ala Cys Trp Gly Asp Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys 90
Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly 105
Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val Asn Gly 114 (SEQ ID NO:1)

The curculin C of the present invention is a sweetness-inducing substance and can be properly added to, for example, foods, drinks, feeds, pet foods and drugs as a sweetener which occurs as a stable dimer and has a potent taste-modification effect.

Since the amino acid sequence of the curculin C of the present invention has been already determined, it can be produced on a mass scale by chemical or genetic engineering techniques, which is highly advantageous.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a CM-Sepharose ion exchange chromatography elution pattern of a curculin C which is obtained from *Curculigo latifolia* fruits through washing with water, extracting and salting out.

FIG. 2 is a Sephadex G-100 molecular sieve chromatography elution pattern of the peak (B) in FIG. 1.

FIG. 3 is a graph showing the activity of curculin C comprising the highly pure taste-modifier according to the present invention.

FIG. 4 is an HPLC elution pattern of a peptide obtained by digesting S-carboxamidomethylated curculin C with lysyl-endopeptidase.

FIG. 5 is an HPLC elution pattern of a peptide obtained by digesting S-carboxamidomethylated curculin C with chymotrypsin.

FIG. 6 is an HPLC elution pattern of a peptide obtained by digesting S-carboxamidomethylated curculin C with trypsin.

FIG. 7 shows the amino acid sequence of curculin C.

FIG. 8 is an HPLC elution pattern of a peptide obtained by digesting the highly pure curculin C with trypsin.

FIG. 9 is an HPLC elution pattern of a peptide obtained by digesting the highly pure curculin C with thermolysin.

FIG. 10 is an HPLC extraction pattern of the peak E4.

FIG. 11 is an HPLC extraction pattern of the peak E4-1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Curculin C of the present invention can be obtained by, for example, the following method.

First, water is added to *Curculigo latifolia* fruits or the sarcocarp thereof and the mixture is homogenized and centrifuged. The supernatant thus obtained has a dark brown color. Further, water as much as, or more than the starting fruits or sarcocarp is added to the precipitate and the resulting mixture is homogenized and centrifuged. Water-washing is repeated until a colorless supernatant is obtained. Thus a precipitate is obtained. None of the supernatants show any taste-modification activity.

Next, the precipitate obtained above is extracted with

an aqueous solution of a salt having a concentration of 0.01M or above. Thus a crude extract containing a curculin C is obtained.

Examples of the salt include hydrochlorides of sodium, potassium, calcium, magnesium and ammonium, phosphates of sodium, potassium, calcium, magnesium and ammonium, carbonates of sodium, potassium, calcium, magnesium and ammonium, sulfates and sulfites of sodium, potassium, calcium, magnesium and ammonium, nitrates and nitrites of sodium and potassium,

lactates of sodium and calcium, alum, burnt alum, sodium acetate, pyrophosphates of sodium and potassium, propionates of sodium and potassium, sodium benzoate, sodium fumarate and polysodium acrylate.

The extraction with the aqueous salt solution as described above may be effected, for example, as follows.

After the completion of the above-mentioned washing with water, a sodium chloride solution is added to the precipitate thus obtained, and the mixture is homogenized, centrifuged or filtered to thereby give a crude extract containing a curculin C.

Next, the crude extract containing the curculin C thus obtained is purified in the following manner so as to give a taste-modifier of a high purity.

The above-mentioned crude extract may be purified by salting out with, for example, ammonium sulfate, sodium sulfate, potassium phosphate, magnesium sulfate, sodium citrate or sodium chloride and treating by common chromatographic procedures. For example, the precipitate obtained by salting out with ammonium sulfate is subjected to CM-Sepharose ion exchange chromatography followed by molecular sieve chromatography. Thus the target curculin C of a high purity can be obtained.

The amino acid sequence (primary structure) of the highly pure curculin C thus obtained may be determined by reducing the highly pure substance, blocking the SH group thereof, hydrolyzing with an enzyme such as trypsin, chymotrypsin or lysyl-endopeptidase, purifying each peptide fragment by HPLC using an aqueous reversed-phase column and then determining the structure of the peptide fragment.

Curculin C, which consists of a dimer of a protein, is obtained in the form of a stable protein having a high taste-modification activity. The dimer is obtained by forming interchain disulfide linkages between the 77th cysteine residues and between the 109th cysteine residues.

The interchain linkage is identified by fragmentating the highly pure curculin C with the use of various proteases such as thermolysin or trypsin, purifying a peptide fragment containing cystine from among the obtained fragments by, for example, HPLC, determining the structure of this peptide fragment and comparing it with the primary structure.

In the monomer of the curculin C of the present invention, furthermore, the 29th cysteine residue forms an intrachain disulfide linkage with the 52nd cysteine residue.

This intrachain linkage is identified in the same manner as the one described above regarding the interchain linkage.

Namely, it is identified by fragmentating the highly pure curculin C with the use of various proteases such as thermolysin or trypsin, purifying a peptide fragment containing cystine from among the obtained fragments by, for example, HPLC, determining the structure of this peptide fragment and comparing it with the primary structure.

Curculin C thus obtained can be used as a taste-modifier. Further, it is preferable that the highly pure curculin C is used in the form of a liquid seasoning of a concentration of 10^{-7} M or above or a solid seasoning of a concentration of 10 ppm w/w % or above.

The highly pure curculin C according to the present invention, which has the above-mentioned amino acid sequence, may be synthesized by an appropriate method, for example, solid-phase synthesis, partial sol-

id-phase synthesis, fragment condensation or solution synthesis, in accordance with the amino acid sequence. Alternately, it may be obtained by recombinant DNA techniques with the use of a suitable host.

Example 1: Water-washing and Extraction with Sodium Chloride Solution

30 g of the sarcocarp of *Curculigo latifolia* fruits was homogenized together with 40 ml of water and then centrifuged at 12,500 r.p.m for 60 minutes. The obtained supernatant had a dark brown color and showed no taste-modification activity. To the obtained precipitate was added 40 ml of water and the mixture was homogenized and centrifuged at 12,500 r.p.m. for 20 minutes. The obtained supernatant was colorless and had no taste-modification activity.

To the obtained precipitate was added a 0.5M sodium chloride solution and the mixture was homogenized and centrifuged at 30,000 r.p.m. for 60 minutes. The supernatant thus obtained was colorless and showed a taste-modification activity. Further, extraction with 40 ml of a 0.5M sodium chloride solution was repeated twice. Then the supernatants were combined to thereby give a crude extract containing a curculin C.

Example 2: Salting Out with Ammonium Sulfate

To the crude extract obtained in the above Example 1 was added ammonium sulfate so as to achieve an 80%-saturation, thus precipitating an active substance. After centrifuging at 32,000 r.p.m. for 60 minutes, the precipitate thus obtained was dissolved in 100 ml of a 0.01M phosphate buffer solution (pH: 6.8).

Example 3: CM-Sepharose Ion Exchange Chromatography

The solution obtained in the above Example 2 was applied to a CM-Sepharose CL-6B column [2.2 cm (diameter) \times 18 cm (length), bed volume: 68 ml, the matrix being a cross-linked derivative of beaded agarose, with a carboxymethyl functionality and with cross-links between polysaccharide chains formed by the reaction of the base matrix with 2,3-dibromopropanol, manufactured by Pharmacia LKB Biotechnology Co.] and adsorbed thereon.

After removing a bypass fraction with a 0.01M phosphate buffer solution (pH: 6.8), the curculin C was eluted by linear gradient elution with a 0-1.0M sodium chloride solution (flow rate: 5 ml/hr, fraction volume: 5 ml, total eluate volume: 500 ml).

The proteins thus eluted were monitored by using the absorbance at 280 nm. FIG. 1 shows the result. The peak (B) shown in FIG. 1 corresponds to fractions containing the curculin C.

Example 4: Gel Filtration Chromatography

To the fractions corresponding to the hatched part of the peak (B) in FIG. 1 was added ammonium sulfate so as to achieve an 80%-saturation, thus precipitating the active substance. After centrifuging at 32,000 r.p.m. for 60 minutes, the obtained precipitate was dissolved in 1.5 ml of a 0.01M phosphate buffer solution (pH: 6.8).

This concentrate was separated with the use of a Sephadex (a beaded gel prepared by cross-linking dextran with epichlorohydrin under alkaline conditions, manufactured by Pharmacia LKB Biotechnology Co.) G-100 column [1.6 cm (diameter) \times 58 cm (length), bed volume: 160 ml] and a 0.01M phosphate buffer solution

(pH: 6.8) containing 0.5M NaCl (flow rate: 8.4 ml/hr, fraction volume: 2.8 ml, total eluate volume: 182 ml).

The proteins were monitored with the use of the absorbance at 280 nm. FIG. 2 shows the result. The peak (A) shown in FIG. 2 corresponds to fractions containing the curculin C.

To the fractions corresponding to the peak (A) in FIG. 2 was added ammonium sulfate so as to achieve an 80%- saturation, thus precipitating the active substance. After centrifuging at 32,000 r.p.m. for 60 minutes, the obtained precipitate was dissolved in 1.5 ml of a 2M ammonium acetate solution. The obtained solution was treated with a Sephadex G-25 (9.1 ml) column equilibrated with a 2M ammonium acetate solution and then freeze-dried. Thus 8.6 mg of a curculin C of a high purity was obtained.

Example 5: SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis

The purity and molecular weight of the highly pure curculin C obtained in the, above Example 4 were confirmed in accordance with Laemmli's method [refer to Nature, 227, 680 (1970)] by SDS polyacrylamide gel electrophoresis with and without using a reducing agent (β -mercaptoethanol).

As a result, a band corresponding to a molecular weight of 13,000 (dalton) was observed in the presence of the reducing agent, while a band corresponding to a molecular weight of 24,000 (dalton) was observed in the absence thereof.

These results indicated that the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 had been sufficiently purified and a dimer had been formed via the formation of disulfide linkages.

Table 1 shows the protein content, activity yield and purity of each fraction obtained from 30 g of the sarcocarp of *Curculigo latifolia* fruits.

TABLE 1

Purification step	Protein content, activity yield and purity of curculin C in each purification step		
	Protein content (g)	Activity yield (%)	Purity (fold)
Sarcocarp	30 (*1)	100	1
0.5M saline extract	0.106	80.0	225
CM-Sepharose eluate	0.018	55.5	940
Sephadex G-100 eluate	0.0086	36.0	1255

*1: sarcocarp weight (including components other than proteins).

The protein contents were determined by the method of Lowry et al.

The taste-modification activity of the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was evaluated in the following manner. After each sample was kept in the mouth for 3 minutes, the mouth was rinsed with water. Then a 0.02M solution of citric acid was tasted and the sweetness was compared with those of sucrose solutions of various concentrations. Thus a sucrose solution showing a sweetness comparative thereto was selected.

FIG. 3 shows the results. As this figure shows, the activity of the highly pure curculin C corresponds to the sweetness of a 0.3M sucrose solution. The taste-modification effect of the highly pure curculin C obtained in the Example 4 was sustained for a long period of time.

Referential Example 1: Isoelectric Focusing

The highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was subjected to isoelectric focusing with the use of Phast Gel IEF5-8 of Phast System TM (manufactured by Pharmacia LKB Biotechnology Co.). It was found that the isoelectric point was 7.1.

Referential Example 2: Confirmation of the Absence of any Free SH Group

1.2 mg (50 nmol) of the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was dissolved in 2.5 ml of a 0.1M tris hydrochloride buffer solution (pH: 8.0) containing 8M of urea and 0.01M of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and allowed to stand at room temperature for 20 minutes.

Then a 0.05M phosphate buffer solution (pH: 7.0) containing 0.01M DTNB [5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] was added thereto and the absorbances of cysteine and the highly pure curculin C were measured at 412 nm.

The absorbance of 50 nmol of the highly pure curculin C was 0.005 or below when measured under such a condition that the absorbance of 50 nmol of cysteine was 0.25.

These facts indicated that no free SH group was contained in the molecule of the highly pure curculin C.

Example 6: Preparation of S-carboxamidomethylated Curculin C.

7 mg of the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was dissolved in 5 ml of a 0.4M tris buffer solution containing 6M of guanidine hydrochloride, 2 mM of EDTA and 60 mM of dithiothreitol. The obtained solution was incubated in a nitrogen gas at 37° C. for 24 hours. Next, 0.2 g of iodoacetamide was added to the solution. After allowing to stand at room temperature for 10 minutes, the mixture was further allowed to stand in an ice/water bath for 60 minutes. The S-carboxamidomethylated curculin C thus obtained was subjected to buffer exchange with a 50 mM sodium bicarbonate buffer solution (pH: 8.0) containing 2M of urea and 2 mM of EDTA by using Sephadex G-25 to thereby give a sample to be digested with an enzyme.

Example 7: Amino Acid Composition

The amino acid composition was determined with a Picotag system (manufactured by Waters Co.).

Namely, 10 μ g of the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was hydrolyzed with 6 N HCl containing 1% of phenol at 110° C. for 22 hours. Then the amino acids thus obtained were phenylthiocarbamylated (PTC) and analyzed by HPLC with the use of a TSK gel ODS-80TM column [0.46 cm (diameter) \times 15 cm (length), manufactured by Tosoh Corp.]. The PTC-amino acids were detected based on the absorbance at 254 nm. Table 2 shows the results.

The data of serine and threonine were corrected by taking the loss due to decomposition, respectively, as 10% and 5%. Regarding cysteine, the S-carboxamidomethylated curculin C prepared in the above Example 6 was employed in the measurement. On the other hand, the content of tryptophan was determined by the method of H. Edelhock [refer to Biochemistry, 7, 1948 (1967)].

TABLE 2

Amino acid composition			
Amino acid	% by mol	Amino acid	% by mol
Asx	17.2	Met	0.4
Thr	5.0	Ile	3.9
Ser	6.6	Leu	13.6
Glx	5.9	Tyr	4.9
Pro	1.1	Phe	1.2
Gly	11.7	Lys	2.9
Ala	5.0	His	2.2
Half-cys	4.0	Arg	5.7
Val	6.4	Trp	2.3
Total		100.0	

Example 8: Enzymatic Digestion of S-carboxamidomethylated Curculin C

The S-carboxamidomethylated curculin C obtained in the above Example 6 was digested with lysyl-endopeptidase in a 50 mM sodium bicarbonate buffer solution (pH: 8.0) containing 2M of urea and 2 mM of EDTA at 37° C. for 17.5 hours. The protein concentration was 1 mg/ml and the enzyme to substrate ratio was 1/120. Then the reaction was terminated by adjusting the pH value of the mixture to 2.0 by HCl.

Further, the S-carboxamidomethylated curculin C was digested with chymotrypsin at 37° C. for 30 minutes under the same conditions of buffer solution, protein concentration and enzyme to substrate ratio as those employed above. The reaction was terminated by the same method as the one described above.

Furthermore, the S-carboxamidomethylated curculin C was digested with trypsin at 37° C. for 3 hours under the same conditions of buffer solution, protein concentration and enzyme to substrate ratio as those employed above. The reaction was terminated by the same method as the one described above.

Example 9: Isolation of Peptide

The three peptide mixtures obtained in the above Example 8 were separated by HPLC with the use of a TSK gel ODS-120T (manufactured by Tosoh Corp.) column. Then each peptide was eluted by linear gradient elution with acetonitrile containing 0.05% of trifluoroacetic acid. The peptide was detected based on the absorbance at 210 nm and each peak was collected.

FIG. 4, FIG. 5 and FIG. 6 show the elution patterns of, respectively, peptide mixtures obtained by lysyl-endopeptidase digestion, peptide mixtures obtained by

chymotrypsin digestion and peptide mixtures obtained by trypsin digestion.

It is to be noted here that the elution patterns of peptide mixtures obtained by the lysyl-endopeptidase digestion and peptide mixtures obtained by the trypsin digestion were obtained by linear concentration gradient elution with 20% (v/v, the balance: water) to 40% (v/v, the balance: water) of acetonitrile for 30 minutes, while that of peptide mixtures obtained by the chymotrypsin digestion was eluted by linear gradient elution with 10% (v/v, the balance: water) to 40% (v/v, the balance: water) of acetonitrile for 45 minutes. The names of the peptides which will be given hereinbelow were assigned in accordance with the names of these peaks.

Example 10: Analysis on amino acid composition and Determination of Amino Acid Sequence

Each peptide obtained in the above Example 9 was subjected to amino acid analysis with a Waters Picotag system. Tables 3 and 4 show the results.

TABLE 3

Amino acid composition of peptide obtained from lysyl-endopeptidase or trypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C (unit: mol/mol of peptide)						
Amino acid	LEP-2	LEP-3	LEP-5	LEP-6	T-11	Curculin
Asx(B)		5.4(5)	13.0(13)	2.7(3)	9.4(10)	(21)
Glx(Z)	1.2(1)	3.2(3)	2.4(2)		1.4(1)	(6)
Cys(C)		0.7(1)	1.4(2)	0.8(1)	0.7(1)	(4)
Ser(S)		2.3(2)	3.8(4)	1.1(1)	2.5(2)	(7)
Gly(G)		2.6(2)	6.9(7)	4.7(5)	4.4(4)	(14)
His(H)		2.2(2)	1.1(1)		1.2(1)	(3)
Thr(T)		3.0(3)	2.0(2)		1.2(1)	(5)
Ala(A)	0.8(1)	3.4(3)	2.7(2)		2.3(2)	(6)
Pro(P)				2.3(2)		(2)
Arg(R)			3.8(4)	3.4(3)		(7)
Tyr(Y)	1.0(1)	1.0(1)	1.9(2)	1.1(1)	1.9(2)	(5)
Val(V)	1.1(1)	1.7(2)	1.7(2)	2.2(3)	2.5(3)	(8)
Ile(I)		1.0(1)	1.9(2)	0.7(1)	0.7(1)	(4)
Leu(L)	2.1(2)	5.2(6)	3.8(4)	2.1(2)	5.9(6)	(14)
Phe(F)				1.2(1)		(1)
Lys(K)	0.8(1)	1.3(2)	0.9(1)		2.3(2)	(4)
Trp(W)			ND(2)	ND(1)	ND(1)	(3)
Total	(7)	(33)	(50)	(24)	(37)	(114)
Assignment	84-90	1-33	34-83	91-114	54-90	
Yield %	55.2	72.4	83.0	68.5	31.3	

The data of serine and threonine were corrected by taking the loss due to decomposition, respectively, as 10% and 5%.

TABLE 4

Amino acid composition of peptide obtained from chymotrypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C (unit: mol/mol of peptide)						
Amino acid	CH-H3	CH-4B	CH-4A	CH-6	CH-10	CH-13
Asx(B)	2.0(2)(*)	1.0(1)	1.6(2)	3.0(3)	11.3(12)	1.4(1)
Glx(Z)		2.0(2)	1.0(1)	1.9(2)		0.8(1)
Cys(C)	0.7(1)		0.8(1)		1.3(2)	
Ser(S)	1.0(1)			2.0(2)	4.2(4)	
Gly(G)	2.5(3)	1.1(1)		2.1(2)	6.6(6)	2.2(2)
His(H)				1.8(2)	1.2(1)	
Thr(T)			1.6(2)	1.1(1)	1.7(2)	
Ala(A)				3.1(3)	2.4(2)	0.7(1)
Pro(P)	1.3(1)					1.2(1)
Arg(R)	1.8(2)	1.1(1)			3.3(3)	1.3(1)
Tyr(Y)			1.0(1)	1.0(1)	2.3(2)	1.2(1)
Val(V)	1.2(1)		2.1(1)	0.9(1)	1.9(2)	2.4(3)
Ile(I)		0.8(1)	0.7(1)		1.1(1)	1.0(1)
Leu(L)	1.3(1)		1.3(2)	4.2(4)	4.5(4)	2.7(3)
Phe(F)						1.0(1)
Lys(K)			1.7(2)		0.9(1)	0.7(1)
Trp(W)		ND(1)(**)			ND(1)	ND(1)
Total	(12)	(7)	(13)	(21)	(43)	(18)

TABLE 4-continued

Amino acid composition of peptide obtained from chymotrypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C (unit: mol/mol of peptide)						
Amino acid	CH-H3	CH-4B	CH-4A	CH-6	CH-10	CH-13
Assignment	103-114	35-41	22-34	1-21	42-84	85-102
Yield %	6.1	18.9	17.5	38.1	15.0	19.3

*: Result of sequence analysis.

**: ND: not detected.

The data of serine and threonine were corrected by taking the loss due to decomposition, respectively, as 10% and 5%.

The amino acid sequence was determined with the

Namely, the peptide was degraded by Edman method and the resulting PTH (phenylthiohydantoin)-amino acid was analyzed by HPLC with the use of a TKS gel ODS-120T column. Table 5 and 6 show the results.

TABLE 5

Amino acid residues identified by Edman degradation of peptides obtained from lysyl-endopeptidase digestion and trypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C						
Cycle	LEP-2 Amino acid (Yield) (p mole)	LEP-3 Amino acid (Yield) (p mole)	LEP-5 Amino acid (Yield) (p mole)	LEP-6 Amino acid (Yield) (p mole)	T-11 Amino acid (Yield) (p mole)	N Amino acid (Yield) (p mole)
1	Tyr(3060)	Asp(861)	Tyr(405)	Asp(244)	Leu(1383)	Asp(264)
2	Ala(4103)	Asn(671)	Gln(496)	Gly(856)	Thr(447)	Asn(146)
3	Leu(2016)	Val(606)	Asn(50)	Arg(72)	Leu(1053)	Val(232)
4	Val(1987)	Leu(495)	Gly(139)	Phe(866)	Leu(1344)	Leu(106)
5	Leu(901)	Leu(703)	Arg(56)	Val(1005)	Ser(346)	Leu(118)
6	Gln(1351)	Ser(85)	Gln(138)	Ile(682)	Asp(937)	Ser(15)
7	Lys(489)	Gly(227)	Ile(171)	Tyr(623)	Gly(864)	Gly(35)
8		Gln(482)	Trp(92)	Gly(457)	Asn(1028)	Gln(96)
9		Thr(120)	Ala(156)	Pro(301)	Leu(615)	Thr(16)
10		Leu(277)	Ser(28)	Val(273)	Val(730)	Leu(77)
11		His(146)	Asn(114)	Leu(196)	Ile(504)	His(28)
12		Ala(338)	Thr(44)	Trp(40)	Tyr(797)	Ala(60)
13		Asp(443)	Asp(151)	Ser(86)	Asp(844)	Asp(78)
14		His(67)	Arg(69)	Leu(199)	His(204)	His(13)
15		Ser(22)	Arg(86)	Gly(216)	Asn(609)	Ser(7)
16		Leu(154)	Gly(75)	Pro(213)	Asn(758)	Leu(33)
17		Gln(133)	Ser(15)	(Asn)	Asn(809)	Gln(21)
18		Ala(119)	Gly(63)	Gly(105)	Asp(603)	Ala(23)
19		Gly(81)	Cys(57)	Cys(66)	Val(281)	Gly(32)
20		Ala(58)	Arg(56)	Arg(21)	Asn(264)	Ala(31)
21		Tyr(57)	Leu(79)	Arg(27)	Gly(298)	
22		Thr(24)	Thr(26)	Val(12)	Ser(193)	
23		Leu(77)	Leu(68)		Ala(201)	
24		Thr(17)	Leu(72)		Cys(150)	
25		Ile(44)	Ser(9)		Trp(27)	
26			Asp(84)		Gly(148)	
27			Gly(38)		Asp(204)	
28			Asn(51)		Asn(31)	
29			Leu(46)		Gly(72)	
30			Val(28)		Lys(17)	
31			Ile(30)		Tyr(28)	
32			Tyr(20)		Ala(38)	
33			Asp(69)		Leu(7)	
34			His(7)		Val(53)	

use of a 470 A Applied Biosystem Protein Sequencer.

TABLE 6

Amino acid residues identified by Edman degradation of peptides obtained from chymotrypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C						
Cycle	CH-H3 Amino acid (Yield) (p mole)	CH-4B Amino acid (Yield) (p mole)	CH-4A Amino acid (Yield) (p mole)	CH-6 Amino acid (Yield) (p mole)	CH-10 Amino acid (Yield) (p mole)	CH-13 Amino acid (Yield) (p mole)
1	Ser(1687)	Gln(81)	Thr(179)	Asp(2395)	Ala(443)	Ala(227)
2	Leu(2813)	Asn(71)	Leu(553)	Asn(2047)	Ser(74)	Leu(116)
3	Ile(2198)	Gly(66)	Thr(147)	Val(1793)	Asn(251)	Val(141)
4	Pro(2673)	Arg(10)	Ile(137)	Leu(941)	Thr(46)	Leu(101)
5	Asn(2401)	Gln(63)	Gln(235)	Leu(1165)	Asp(133)	Gln(112)
6	Gln(1596)	Ile(60)	Asn(175)	Ser(132)	Arg(53)	Lys(68)
7	Cys(2302)	Trp(6)	Lys(152)	Gly(582)	Arg(93)	Asp(96)
8	Arg(1553)		Cys(188)	Gln(797)	Gly(85)	Gly(93)
9	Arg(1735)		Asn(161)	Thr(273)	Ser(32)	Arg(30)
10	Val(1547)		Leu(45)	Leu(596)	Gly(60)	Phe(39)
11	Asn(862)		Val(37)	His(278)	Cys(65)	Val(74)
12	Gly(150)		Lys(7)	Ala(713)	Arg(21)	Ile(20)

TABLE 6-continued

Amino acid residues identified by Edman degradation of peptides obtained from chymotrypsin digestion of S-carboxamidomethylated curculin C						
	CH-H3	CH-4B	CH-4A	CH-6	CH-10	CH-13
	Amino acid	Amino acid	Amino acid	Amino acid	Amino acid	Amino acid
	(Yield)	(Yield)	(Yield)	(Yield)	(Yield)	(Yield)
Cycle	(p mole)	(p mole)	(p mole)	(p mole)	(p mole)	(p mole)
13			Tyr(9)	Asp(881)	Leu(47)	Tyr(32)
14				His(149)	Thr(12)	Gly(41)
15				Ser(58)	Leu(68)	Pro(11)
16				Leu(321)	Leu(74)	Val(7)
17				Gln(230)	Ser(8)	Leu(3)
18				Ala(330)	Asp(17)	Trp(3)
19				Gly(187)	Gly (11)	
20				Ala(341)	Asn(13)	
21				Tyr(118)	Leu(24)	
22					Val(6)	
23					Ile(3)	
24					Tyr(3)	
25					Asp(13)	

The carboxyl-terminal amino acid sequence was determined by using carboxypeptidase by the following method.

Namely, 200 μ g of the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was dissolved in 0.9 ml of an N-ethylmorpholineacetate buffer solution (pH: 8.0).

To the obtained solution was added 10 μ g of carboxypeptidase A and the reaction mixture was incubated at room temperature. Some portions of the reaction mixture were sampled 15, 30, 60 and 120 minutes after the initiation of the incubation. Trichloroacetic acid was added to each sample to thereby precipitate proteins. After removing the precipitate, amino acids contained in the supernatant were analyzed with a Waters Picotag system. As a result, it was clarified that the carboxyl-terminal amino acid residue was glycine.

FIG. 7 shows the amino acid sequence determined by the above-mentioned method.

In FIG. 7, LEP, CH and T represent peptides obtained by digesting with, respectively, lysyl-endopeptidase, chymotrypsin and trypsin, while N represents the amino acid sequence of the highly pure curculin C determined by Edman degradation starting with the N-terminal.

A solid line shows the amino acid residues of each peptide which were identified by Edman degradation, while a dotted line shows the amino acid residues of each peptide which were not identified by Edman degradation.

Example 11: Analysis on Amino Acid Composition containing Cysteine or Cystine by Performic Acid Oxidation Method

0.1 ml of a 30% aqueous solution of hydrogen peroxide was added to 1.9 mg of formic acid to thereby give a performic acid solution. Next, 50 μ l of this solution was added to the highly pure curculin C or the peptide fragments (0.5 nmol-1 nmol) obtained by digesting with enzymes to conduct a reaction at 0° C. for 25 hours.

After the completion of the reaction, the performic acid solution was dried and subjected to amino acid analysis with the use of a Waters Picotag system. Thus amino acid compositions containing cysteine or cystine described in the following Examples 12 to 14 were determined.

Example 12: Determination of Intrachain Disulfide Linkage between the 29th Cysteine Residue and the 52nd Cysteine Residue

The highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was digested with trypsin. Namely, 0.5 mg of the highly pure curculin C was dissolved in 200 μ l of a 0.25M ammonium acetate buffer solution (pH: 6.5) containing 8M of urea and 2 mM of calcium acetate and denatured therein at 37° C. for 4 hours.

Next, this solution was diluted with a 0.25M ammonium acetate buffer solution (pH: 6.5) containing 2 mM of calcium acetate in such a manner as to adjust the final urea concentration to 2M.

To the resulting solution of the highly pure curculin C was added trypsin so as to give an enzyme to substrate ratio (by weight) of 1/25. After digesting at 37° C. for 3 hours, the digested mixture was subjected to HPLC under the following conditions to thereby collect each peptide. FIG. 8 shows the results.

Conditions for HPLC:

column: TSK gel ODS-120T,

mobile phase: Aqueous solution of acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid (linear concentration gradient from 10% v/v to 60% v/v, 40 minutes),

detection: UV detector 210 nm (range: 0.5), and

flow rate: 1 ml/min.

The amino acid composition and the amino acid sequence of the substance corresponding to the fraction T2 shown in FIG. 8, from among the peptides thus obtained, were analyzed by the same methods as those described in the above Example 10. Tables 7 and show the results.

TABLE 7

Analysis on amino acid composition of peptide T2 (unit: mol/mol of peptide)							
Amino acid	Asn	Ser	Gly	Arg	Val	Leu	Lys
	0.9	1.0	2.1	0.6	1.1	1.2	0.7

TABLE 8

Analysis on amino acid sequence of peptide T2 (unit: pmol)					
Cycle	1	2	3	4	5
Amino (p mole)	Gly 481	Ser 168	Gly 401	Cystine 7	Arg 69
		Asn	Leu	Val	Lys

TABLE 8-continued

Analysis on amino acid sequence of peptide T2 (unit: pmol)					
Cycle	1	2	3	4	5
		289	416	401	181

Thus it was confirmed that an intrachain linkage was formed between the 29th cysteine residue and the 52nd cysteine residue.

Example 13: Determination of the Position of Interchain Linkage between 77th Cysteine residues

The highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was digested with thermolysin.

Namely, 10 mg of the highly pure curculin C was dissolved in a 0.25M ammonium acetate buffer solution (pH: 6.5) containing 8M of urea and 2 mM of calcium acetate.

Thermolysin was added to a 0.25M ammonium acetate buffer solution (pH: 6.5) containing 2 mM of calcium acetate and dissolved therein.

To the above-mentioned solution containing the highly pure curculin C was added the thermolysin solution so as to give an enzyme to substrate ratio (by weight) of 1/25, followed by digesting at 37° C. for 15 hours.

Then the digested mixture was subjected to HPLC under the following conditions to thereby collect the peptide corresponding to each peak. FIG. 9 shows the results. Conditions for HPLC:

column: TSK gel ODS-120T,

mobile phase: aqueous solution of acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid (linear gradient from 10% v/v to 60% v/v, 40 minutes),

detection: UV detector 210 nm (range 0.5), and flow rate: 1 ml/min.

Subsequently, the amino acid composition of the peptide of each peak was analyzed by the same method as the one employed in the above Example 11. As a result, cysteic acid was detected from the fraction of the peak E4 shown in FIG. 9 (0.30 pmol/mol). Thus the fraction of the peak E4 was further separated by HPLC.

The separation was carried out under the same conditions as those of the above HPLC except that the mobile phase was eluted by linear gradient with acetonitrile of 20% v/v to 40% v/v for 40 minutes.

The separated peptide of each peak was collected and then the amino acid composition was analyzed by the same method as the one described in Example 11 to thereby detect cysteic acid. FIG. 10 shows the results.

As a result, cysteic acid was detected from the fraction of the peak E4-1 shown in FIG. 10 (0.41 pmol/pmol). Thus the fraction of the peak E4-1 was further separated by HPLC.

The separation was carried out under the same conditions as those of the above HPLC except that the mobile

phase was eluted by linear concentration gradient with acetonitrile of 20% v/v to 30% v/v for 40 minutes.

As a result, two peptides (peaks) of V-1 and V-2 were obtained as FIG. 11 shows.

The amino acid composition of each peptide was analyzed by the same method as those employed in the above Examples 10 and 11. Table 9 shows the results.

TABLE 9

Amino acid composition of peptide V-1 (unit: mol of each amino acid/mol of peptide)					
Amino acid	Asx	Ser	Gly	Ala	Trp
	2.5(3)	1.4(1)	3.6(3)	1.4(2)	
	Tyr	Lys	Val	Cys*	
	0.6(1)	0.5(1)	1.3(1)	0.5(1)	ND(1)

*: results of performic acid oxidation method (Example 11).

Further, the amino acid sequence of the peptide of the fraction V-1 was analyzed. As a result, cystine was found in the 6th cycle and the formation of an interchain disulfide linkage at the 77th cysteine residue of the protein was confirmed. Table 10 shows the results.

TABLE 10

Analysis on amino acid sequence of peptide V-1 (unit: pmol)					
Cycle	1	2	3	4	5
Amino acid (pmole)	Val 1537	Asn 606	Gly 1850	Ser 314	Ala 906
Cycle	6	7	8	9	10
Amino acid (pmole)	Cystine 14	Trp 156	Gly 632	Asp 287	Asn 337
Cycle	11	12	13	14	
Amino acid (pmole)	Gly 534	Lys 257	Tyr 186	Ala 145	

Example 14: Determination of the Position of Interchain Linkage of the 109th Cysteine residues

Similar to the above Example 13, the highly pure curculin C obtained in the above Example 4 was digested with an enzyme. Then a digestion fragment containing cystine was taken out of the digestion product to determine the structure. As a result, it was confirmed that the 109th cysteine of the protein formed an interchain disulfide linkage.

The structure of the curculin C thus determined is as follows.

Namely, the 29th cysteine residue and the 52nd cysteine residue form an intrachain disulfide linkage together and both of the 77th cysteine residues and the 109th cysteine residues form interchain disulfide linkages, thus giving a dimer. Further, the curculin C of the present invention has an amino acid sequence as specified in the following sequence list as a monomer.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i i i) NUMBER OF SEQUENCES: 1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 114 amino acids

-continued

(B) TYPE: AMINO ACID
(C) STRANDEDNESS: Not Applicable
(D) TOPOLOGY: linear

(i i) MOLECULE TYPE: protein

(v i) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Curculigo latifolia*

(x i) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Asp	His	Ser	1	5	10	15
Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Cys	Asn	20	25	30	
Leu	Val	Lys	Tyr	Gln	Asn	Gly	Arg	Gln	Ile	Trp	Ala	Ser	Asn	Thr	35	40	45	
Asp	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Gly	50	55	60	
Asn	Leu	Val	Ile	Tyr	Asp	His	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Asn	Gly	Ser	65	70	75	
Ala	Cys	Trp	Gly	Asp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Lys	80	85	90	
Asp	Gly	Arg	Phe	Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Trp	Ser	Leu	Gly	95	100	105	
Pro	Asn	Gly	Cys	Arg	Arg	Val	Asn	Gly							110			

What is claimed is:

1. Curculin C, having interchain disulfide linkages between the 77th cysteine residues of two monomer chains and between the 109th cysteine residues of said two monomer chains, thus giving a dimer, each said monomer chain having an amino acid sequence as specified in SEQ ID No:1, and each said monomeric chain having an intrachain disulfide linkage between the 29th cysteine residue and the 52nd cysteine residue, said curculin C being obtained by extracting *Curculigo latifolia* fruits or sarcosarp thereof with an aqueous salt

solution, thereafter salting out a crude extract from the salt solution and subjecting the resultant precipitate to purification by CM-Sepharose ion exchange chromatography followed by gel filtration chromatography with the use of a Sephadex G-100 column, said curculin C being characterized by a single peak being obtained when said curculin C is separated with the use of a Sephadex G-100 column and 0.01M phosphate buffer solution of pH 6.8, containing 0.5M NaCl .

* * * * *

45

50

55

60

65